

Zur Messung des Membranpotentials und dessen lichtabhängigen
Änderungen an Blattzellen höherer Landpflanzen.

Dem Fachbereich Biologie
der
Technischen Hochschule Darmstadt
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
vorgelegte

Dissertation

eingereicht von
Enno Brinckmann
aus Holzminden/Weser

Berichterstatter: Prof. Dr. U. Lüttge
Mitberichterstatter: Prof. Dr. W.R. Ullrich

Tag der Einreichung: 15.10.1973
Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1973

Darmstadt 1973

- D 17 -

Diese Arbeit wurde
im Fachbereich Biologie - Botanik -
der Technischen Hochschule Darmstadt
unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. U. Lüttge
in der Zeit von April 1971 bis Oktober 1973 angefertigt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	5
2 <u>Material und Methoden</u>	10
2.1 Lösungen, Abkürzungen	10
2.2 Pflanzen	10
2.3 Elektroden	11
2.3.1 Herstellung der Mikroelektroden	12
2.3.2 Eigenschaften der Mikroelektroden	13
2.3.3 Elektrodenhalter	14
2.4 Versuchsaufbau	14
2.5 Ionenbestimmung	17
2.6 Messung der Atmung, O ₂ -Entwicklung, CO ₂ -Fixierung und der lichtinduzierten pH-Änderungen	17
3 <u>Zur Messung von Membranpotentialen an Blattzellen höherer Landpflanzen</u>	18
4 <u>Versuche mit panaschierten Oenothera-Mutanten</u>	26
4.1 Grüne Kontrollpflanzen	28
4.1.1 Lichtinduzierte Oszillationen des Membranpotentials	28
4.1.2 Wirkung des langwelligen Lichtes	29
4.2 Panaschierte Blätter	32
4.2.1 Vollkommen mutierte Blätter	34
4.2.2 Teilmutierte und weiß-grüne Bezirke	34
4.3 Verteilung der Plasmodesmen in den panaschierten Blättern	37
4.4 Wirkung von Cycloheximid auf Oszillationen des Membranpotentials, Atmung, O ₂ -Entwicklung, CO ₂ -Fixierung und lichtinduzierte pH-Änderungen	43
4.5 Diskussion	47
5 <u>Versuche mit ergrünender etiolierter Gerste</u>	55
5.1 Ergrünung im Weißlicht	55
5.2 Ergrünung im Dunkelrotlicht	60
5.3 Ionengehalt der Blätter (K, Na, Cl)	62
5.4 Ruhepotential	63
5.5 Diskussion	67
6 <u>Zusammenfassung</u>	73
7 <u>Literatur</u>	76

1 Einleitung

Anfang der dreißiger Jahre gelang es UMRATH (1930), zum ersten Male mit Hilfe von feinen Glaskapillaren, die mit einer Salzlösung als elektrischem Leiter gefüllt waren, große Characeen-Zellen anzustechen und auf diese Weise eine reproduzierbare Spannung zwischen dem Inneren der Zelle und dem sie umgebenden Medium zu messen. Diese Spannung nennt man Membranspannung, bioelektrisches Potential, Ruhepotential, Potentialdifferenz oder Membranpotential.

Mit dieser Technik der intrazellulären Membranpotentialmessung wurden in der Folgezeit hauptsächlich an tierischen Zellen Ableitungen gemacht, die die Grundlagen der modernen Sinnes- und Nervenphysiologie lieferten. Erst später wandte man sich wieder pflanzlichen Zellen zu, da die Messung des Membranpotentials bei Pflanzenzellen größere Schwierigkeiten aufweist als bei tierischen Zellen, die nur von einer feinen Membran umgeben sind im Gegensatz zur festen Zellwand der Pflanzen.

Während bei tierischen Objekten die Erregbarkeit und Erregungsleitung der Nervenzellen im Mittelpunkt der Untersuchungen steht, interessiert bei Pflanzenzellen mehr der Zusammenhang mit dem Mineralstoffwechsel, da das Membranpotential für Tier- und Pflanzenzellen bei der Aufnahme von Ionen aus der Umgebung eine wichtige Rolle spielt (vgl. DAVIS 1972). Dabei können die Ionen wegen ihrer elektrischen Ladung z.B. entlang dem Spannungsgefälle, das durch den unterschiedlichen äußeren und inneren Ladungszustand der Membran entsteht, passiv transportiert werden. Die Aufnahmerate hängt u.a. von den Ladungsverhältnissen der Ionen und der Membran und von der Permeabilität der Membran für die einzelnen Ionen ab.

Die Entstehung des Membranpotentials ist noch nicht restlos geklärt; nachdem sich die unterschiedliche Verteilung von Ionen auf Grund verschiedener Permeabilitäten durch die Membran als nicht ausreichend für seine Erklärung herausgestellt hatte, werden in letzter Zeit häufiger elektrogene Ionenpumpen als mögliche Ursache herangezogen. Zusammenfassungen dieser Hypothesen finden sich bei BENTRUP 1971 und HIGINBOTHAM 1973.

Die Ionenpumpen sind Orte aktiver Ionentransporte in der Membran, d.h. es werden Ionen unter Verbrauch von Energie gegen ein Konzentrations- oder Spannungsgefälle transportiert; durch Anhäufung oder Verarmung an verschiedenen geladenen Ionen diesseits oder jenseits der Membran werden neue Spannungsverhältnisse geschaffen: die Pumpe ist elektro- gen. Über die Bereitstellung der Energie für diese Prozesse gibt es verschiedene Hypothesen, deren älteste die LUNDEGÅRDH-Hypothese ist, nach der eine direkte Koppelung zwischen Ionen- transport und der Elektronentransportkette in den Mitochon- drien besteht. Neuere Hypothesen, die u.a. auch ATP als Ener- gielieferanten für die aktive Ionenaufnahme einbeziehen, sind in den Werken von EPSTEIN (1972) und LÜTTGE (1973b) zu- sammengestellt.

Auf Grund der cytologischen Unterschiede zwischen einer Tier- und einer Pflanzenzelle ergeben sich weitere Schwie- rigkeiten beim Bestimmen des Membranpotentials. Durch die Unterteilung der Pflanzenzelle in verschiedene Kompartimente kommt es zur Ausbildung mehrerer Membranpotentiale, die das einfache Bild des Ruhepotentials zwischen dem "Inneren" der Zelle und dem Außenmedium komplizieren. Bei den meisten Pflanzenzellen hat das Plasmalemma das größte gemessene Mem- branpotential, jedoch gibt es auch Zellen, bei denen haupt- sächlich der Tonoplast für die Spannung zwischen Vakuole und Außenmedium verantwortlich ist. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse gibt SCHILDE (1968b). Auch an der Chloroplasten- membran konnte in vivo eine Potentialdifferenz gegenüber dem Cytoplasma mit Mikroelektroden gemessen werden (BULYCHEV et al. 1972a). Ebenso hat die Zellwand ein vom Außenmedium ver- schiedenes Potential (KURELLA 1969, VREDENBERG 1971a); dies ist jedoch kein Membranpotential, sondern eine Spannung, die durch fest gebundene negative Ladungen innerhalb der Zell- wand verursacht wird (DONNAN-Phase der Zellwand).

Im Ruhezustand der Zelle befinden sich die passiven Ionen- flüsse, die zelleinwärts und zellauswärts gerichtet sein können, im Gleichgewicht, ebenso die aktiven Ionentransport- prozesse. Die in diesem Zustand bestehende Polarisierung der Membran nennt man Ruhepotential. Eine Störung dieses Gleichgewichtszustandes durch Veränderung der Membraneigen-

schaften (z.B. der Permeabilität oder durch An- oder Abschalten der Ionenpumpen) oder der Umgebung (z.B. der Ionenkonzentration) bringt das Potential aus der Ruhelage. Die bekanntesten vorübergehenden Potentialveränderungen sind die Aktionspotentiale oder spikes in tierischen Nervenzellen. Ihnen liegt eine schlagartige Erhöhung der Membranpermeabilität für Natrium zugrunde, die spontan bei einem bestimmten Polarisierungsgrad der Membran auftritt; durch Überschreiten dieses Schwellenwertes wird eine Alles- oder Nichts-Reaktion in Gang gesetzt, die von der Stärke des auslösenden Reizes unabhängig ist. Auch bei Pflanzenzellen lassen sich derartige Aktionspotentiale auslösen; Zusammenfassungen über diese Phänomene bei Pflanzen lieferten SCHILDE 1968b und PICKARD 1973. Die Aktionspotentiale sind nur von kurzer Dauer und kehren rasch nach Durchlaufen ihrer maximalen Höhe auf das alte Ruhepotential zurück, wobei noch kurze, gedämpfte Nachschwingungen mit kleinerer Amplitude auftreten können.

Im Gegensatz zu dem Alles- oder Nichts-Prinzip der Aktionspotentiale sind viele der vorübergehenden Potentialänderungen, die man durch Beleuchtungswechsel an grünen Pflanzenzellen auslösen kann, von der Reizstärke, d.h. der Lichtintensität abhängig. Sie verlaufen häufig in Form von stark gedämpften Oszillationen. Dabei zeigen die Membranpotentiale der einzelnen Zellkompartimente verschieden starke Reaktionen (VREDENBERG 1971a, BULYCHEV et al. 1972b); die Richtung und Größe dieser photoelektrischen Effekte ist dabei keineswegs bei allen Pflanzen gleich (BENTRUP 1971, HANSEN u. GRADMANN 1971). Generell lassen sich vielleicht schnelle und langsame photoelektrische Effekte unterscheiden: die schnellen spielen sich im Bereich zwischen Millisekunden und wenigen Sekunden ab (z.B. SCHILDE 1968a), bei den langsamen dauert es Minuten bis Stunden, bevor sich das Potential wieder auf einen konstanten Wert eingestellt hat (z.B. LÜTTGE u. PALLAGHY 1969). Eine Unterscheidung erscheint deshalb möglich, weil die beiden Effekte zumindest bei Acetabularia verschiedene Aktionsspektren haben (SCHILDE 1968a). VREDENBERG u. TONK (1973) trennen die Reaktion des Membran-

potentials von Nitella ebenfalls in einen Kurzzeit- (0,5 - 2 min) und Langzeitlichteffekt (2 - 20 min) wegen des unterschiedlichen Verhaltens des Membranwiderstandes nach Belichtung.

Bei Nitella ist die Kinetik der Membranpotentialänderungen am Tonoplast die gleiche wie am Plasmalemma, d.h. die in der Vakuole gemessenen Potentialänderungen sind zum größten Teil Änderungen des Plasmalemmapotentials (VREDENBERG 1971a, 1972). Deshalb wird meistens eine Elektrode bis in die Vakuole eingestochen und die Änderung des Potentials Vakuole - Außenmedium untersucht.

Der Entstehungsort dieser Lichteffekte ist sicherlich in den Chloroplasten zu suchen, da sich die Photosynthese als Hauptursache der meisten lichtinduzierten Potentialänderungen herausgestellt hat. Experimentell wurde das von BULYCHEV et al. (1972a) nachgewiesen, die lichtinduzierte Änderungen des Membranpotentials Chloroplast - Cytoplasma auslösen konnten.

Über die Photosynthese könnte das Licht auf verschiedene Weise wirken (BENTRUP 1971): 1) Änderung der wichtigsten Ionen-Permeabilitäten bzw. deren Relationen, 2) Änderung der cytoplasmatischen Ionenkonzentrationen, 3) Steuerung der elektrogenen Pumpen. Der 3. Möglichkeit scheint hierbei die größte Bedeutung zuzukommen. Daneben wird auch ein direkter Einfluß des Lichtes auf das Plasmalemma diskutiert (SCHILDE 1968a). Ob das Phytochromsystem über den TANADA-Effekt (TANADA 1968, 1972; JAFFE 1968) einen Einfluß auf die hier genannten, intrazellulär gemessenen Lichteffekte hat, ist bisher nicht geklärt (vgl. BENTRUP 1971).

Die Ergebnisse in der Untersuchung der Frage nach der Natur der photoelektrischen Effekte wurden mit mehreren Methoden erzielt: viele Autoren benutzten Hemmstoffe, deren Wirkung auf andere physiologische Prozesse bekannt war, z.B. Entkoppler und Hemmstoffe des Photosystems II (ANDRIANOV et al. 1969, LÜTTGE u. PALLAGHY 1969, VREDENBERG 1969, 1971a, GRADMANN 1970, JESCHKE 1970, THROM 1971a, 1972, BENTRUP et al. 1973) und in Verbindung damit künstliche Elektronendonatoren und -akzeptoren (THROM 1971a, VREDENBERG 1971 b,

BULYCHEV et al. 1972b); andere Autoren konnten durch Änderung des umgebenden Mediums (pH, Temperatur, CO₂-Konzentration) die Effekte beeinflussen (ANDRIANOV et al. 1968, SCHILDE 1968a, DENNY u. WEEKS 1970, GRADMANN 1970, THROM 1970, BULYCHEV et al. 1971, BROWN et al. 1972); ebenso wurde die Abhängigkeit von der Intensität und der Wellenlänge des eingestrahltten Lichtes (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969, OSMOND et al. 1969, SCHILDE 1968a, VREDENBERG 1969, GRADMANN 1970, THROM 1971b, BULYCHEV et al. 1971, 1972 a, 1972b) und die Kinetik der Effekte bei Lichtpulsen (HANSEN u. GRADMANN 1971) untersucht. Weiteren Aufschluß ergab die Korrelation mit lichtinduzierten Ionenflüssen (PALLAGHY u. LÜTTGE 1970).

In der folgenden Arbeit wird versucht, mit Photosynthesemangelmутanten von Oenothera, durch Vergleich mit den Ergrünungskinetiken anderer lichtabhängiger Prozesse bei der Gerste, mit Hilfe eines Hemmstoffs und Lichtes verschiedener Wellenlänge neue Erkenntnisse über die lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials von Blattzellen höherer Pflanzen zu gewinnen. Bei Oenothera-Mutanten ist der Ausfall spezieller Photosynthesereaktionen genetisch fixiert, d.h. die Untersuchung der Membranpotentialeffekte erfolgt an einem in sich stabilen System; das bietet den Vorteil, daß hier keine Sekundäreffekte auftreten können, wie sie häufig an "spezifischen" Hemmstoffen beobachtet werden. Das gleiche Argument gilt für die Untersuchungen an ergrünender Gerste: die Ergrünung ist ein von der Pflanze selbst gesteuerter natürlicher Prozeß, der mit den verschiedensten experimentellen Methoden abgefragt werden kann.

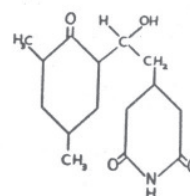
Ebenfalls an Oenothera-Panaschüren wird - auch strukturell- die Weiterleitung elektrischer Signale im Blattgewebe untersucht. Es wird dabei kein von außen appliziertes Signal, sondern die in den grünen Zellen entstehenden Lichteffekte des Membranpotentials verwendet, die in die weißen Zellen übertragen werden. Auf diese Weise wird ein zusätzlicher Eingriff in das Gewebe durch Reizelektroden und -ströme vermieden. Nachteile, die sich aus der genannten Materialauswahl ergeben, sowie meßtechnische Schwierigkeiten, werden in einem gesonderten Kapitel beschrieben.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen, Abkürzungen

Die Versuchslösung (APW) bestand aus 1 mM NaCl + 0,1 mM KCl + 0,05 mM CaSO₄ in aqua bidest, (pH etwa 6,1).

Cycloheximid (= Actidion, Firma Schuchardt) wurde in der Konzentration von 10 µg/ml APW ($= 3,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$) verwendet. Der pH-Wert des APW ändert sich durch Zugabe von CH nicht.



Cycloheximid

Abkürzungen:

APW	= artificial pond water (Versuchslösung)
ATP	= Adenosintriphosphat
CH	= Cycloheximid
DCMU	= 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1, 1-dimethylharnstoff
MES	= 2(N-Morpholin)-äthansulfonsäure
n	= Anzahl der Einzelwerte (zur Berechnung des Mittelwertes)
PS	= Photosystem

Bei Fehlerangaben ist unter der Standardabweichung die Wurzel aus der Summe der Abweichungsquadrate vom Mittelwert (\bar{x}) dividiert durch n-1 zu verstehen; beim Standardfehler heißt der Divisor $n(n-1)$ (CAVALLI-SFORZA 1964):

Es wurde nicht nachgeprüft, ob die Einzelwerte normal verteilt sind.

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die meisten Versuche wurden mehrfach mit dem gleichen Ergebnis durchgeführt.

2.2 Pflanzen

Von der Nachtkerze Oenothera wurden vier verschiedene Bastarde verwendet:

- 1) Hookeri standard (Plastom I) x selbst
- 2) albicans . hookeri II
aus Hookeri percurvans II x Hookeri standard (Plastom II)
- 3) albicans . hookeri IV/II α
aus albicans . percurvans IV x Hookeri II α
- 4) albicans . hookeri IV/II γ
aus albicans . percurvans IV x albicans . hookeri II γ

Ihre Samen keimten in Petrischalen auf Filterpapier mit 10^{-4}M CaSO_4 im Brutschrank bei 25°C unter Fluora- und weißen Neon-Lampen aus. Die Keimlinge wurden in Bodenkultur im Gewächshaus weitergezogen. Für die Versuche wurden die Blätter im Gewächshaus abgeschnitten, in einem Glas unter Wasser getaucht ins Labor gebracht. Die rein grünen Pflanzen 1 und 2 dienten als Kontrollen; die Pflanzen 3 und 4 hatten neben rein grünen Blättern panaschierte Blätter; dabei traten mehrere Farbabstufungen in einzelnen Sektoren von hellgelb bis dunkelgrün auf (vgl. STUBBE 1955), die durch Trennung der Pastome IV und $\text{II}\alpha$ bzw. $\text{II}\gamma$ in den verschiedenen Gewebeschichten entstanden sind.

Samen der Sommergerste Hordeum vulgare wurden in Leitungswasser einige Stunden vorgequollen, gewaschen und 6 Tage in vollständiger Dunkelheit bei 27°C und erhöhter Luftfeuchtigkeit auf KNOP'scher Nährlösung (unter Zusatz von einigen Tropfen A-Z-Lösung nach HOAGLAND) schwimmend angezogen. Die Nährlösung wurde ständig von Luft durchblubbert. Am 7. Tag wurden die Pflanzen auf ihren Plexiglassieben in die Klimakammer gebracht, wo sie auf frischer, durchlüfteter Nährlösung ergrünten bei 25°C , 65 % rel. Feuchte und unter einer Xenon-Lampe mit ca. 8500 Lux (gemessen mit Luxmeter Panlux, Firma Gossen) entsprechend ca. $74 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ (gemessen mit einer Thermosäule, Firma Kipp & Zonen, und einem Mikrovoltmeter) in Pflanzenhöhe. Die Ergrünung in Dunkelrotlicht fand in einer Kammer bei 25°C und ca. $15 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ (5 Glühlampen, Plexiglasfilter Nr. 501 rot 2 mm und Nr. 627 blau 4 mm von Röhm & Haas, Darmstadt) statt. Für jeden Versuch wurde ein Keimblatt in der Klimakammer abgeschnitten und in einer schwarzen Plastiktüte in das Labor gebracht. Dort wurde das Blattstück innerhalb von wenigen Minuten bei Raumbeleuchtung präpariert und etwa eine Stunde in der Küvette untersucht.

2.3 Elektroden

Ausführliche Beschreibungen der elektrophysiologischen Methoden finden sich bei KERN 1966, BUREŠ et al. 1967, LAVALLÉE et al. 1969, GEDDES 1972.

2.3.1 Herstellung der Mikroelektroden

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der Mikro-Glaskapillarelektroden dienten Pyrex-Glaskapillaren mit einem Außendurchmesser von 1,50 - 1,55 mm und ca. 0,9 mm Innendurchmesser. Die Kapillaren wurden in 5 cm lange Stücke geschnitten, nach Außendurchmessern auf 0,05 mm genau sortiert, die scharfen Kanten an den Enden durch leichtes Anschmelzen entfernt, in heißem Mucosol gewaschen, danach 2 x einen Tag in bidestilliertem Wasser gespült und im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Spülen wurden die Kapillaren nur noch mit der Pinzette angefaßt (bewährt hat sich eine selbstgefertigte Pinzette, an deren Spitzen je ein Messingblöckchen mit dem Hohlprofil der Kapillaren angelötet war). Diese Kapillaren wurden mit einem senkrecht arbeitenden Elektrodenziehgerät (Firma Getra, München) zu Mikrokapillaren ausgezogen und mit einem Gummiring zu zweit auf einem Objektträger befestigt. Um bei dem Füllen der Mikrokapillaren größere Luftblasen zu vermeiden, wurden in den Schaft der Kapillaren so tief wie möglich gereinigte Fäden von Glaswolle hineingesteckt. Zum Füllen wurden die Objektträger in einen Halter aus Plexiglas gestellt, die Kapillaren mit der Spitze in gefiltertes 3M KCl getaucht und die Spitzen mindestens 15 Minuten bei Zimmertemperatur und reduziertem Druck (Drehschieberpumpe, Firma Edwards) kapillar gefüllt; danach wurde belüftet, die Kapillaren in die KCl-Lösung vollständig untergetaucht und wieder mindestens 15 Minuten evakuiert (die KCl-Lösung kocht bei diesem Druck). Nach dem Füllen wurden die Glasfäden entfernt, die Schäfte der Kapillaren außen mit Zelloststoff abgetrocknet und die Kapillaren so mit dem Schaft an Terostat-Kitt in ein verschließbares Glasgefäß geklebt, daß die Spitzen in 3M KCl tauchten. Bei etwa der Hälfte der Elektroden blieben in dem dünn ausgezogenen Teil der Kapillaren Luftblasen zurück; diese wurden mit von Hand gezogenen Glasfäden unter dem Binokular (50 x) entfernt. Diese Vergrößerung war ausreichend für die Kontrolle der Elektroden auf Luftblasen und Verschmutzungen. Die Elektroden wurden innerhalb von 2 Tagen nach dem Füllen verwendet. Vor dem Aufstecken auf den Elektrodenhalter wurde etwas KCl aus dem Schaft

gesaugt, um ein Auskristallisieren am Ag/AgCl-Draht zu verhindern, welches sich in spontanen periodischen Spannungsänderungen äußert.

2.3.2 Eigenschaften der Mikroelektroden

Der Außendurchmesser an der Spitze der Elektroden betrug bei den ersten Versuchen mit Oenothera etwa 2 μm . Häufig platzten die Zellen beim Anstich, das Ruhepotential der Zellen war oft von einem starken Rauschen überlagert und brach nach Anstich der Oenothera-Zellen leicht durch Erschütterungen im Gebäude zusammen. Gelegentlich wurde das Eindringen von Plasma ins Innere der Elektrode beobachtet. Im Folgenden wurde deshalb mit Elektroden gearbeitet, deren Außendurchmesser $< 0,5 \mu\text{m}$ betrug (Abb.1).

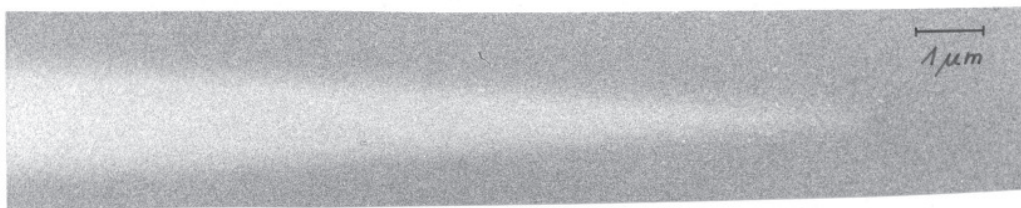


Abb.1: Spitze einer Mikrokapillarelektrode, sichtbar gemacht als Schatten auf einem Formvar/Kohle-Film durch Bedampfen mit Gold/Palladium im Hochvakuum und anschließender elektronenmikroskopischer Vergrößerung (11000:1): Außendurchmesser ca. 0,2 μm .

Der Widerstand der Elektroden wurde in 3M KCl über einen Silberchlorid-Draht (Ag/AgCl, Referenz: Ag/AgCl-Draht) mit einem Heathkit Solid State Transistor Voltmeter (IM-17U) gemessen. Die in Abb. 1 gezeigte Elektrode stammte aus einer Serie von 10 Elektroden mit Widerständen von 7,5 bis 11,5 Megohm (Mittelwert 9 Megohm). Elektroden mit Widerständen < 4 Megohm wurden verworfen. In der Versuchslösung (APW) betrug der Widerstand das 2,7fache des Wertes in 3M KCl bei Messung mit abgeschirmten Kabeln.

Weitere Eigenschaften der Mikroelektroden und ihr Verhalten bei Membranpotentialmessungen werden in Kapitel 3 beschrieben.

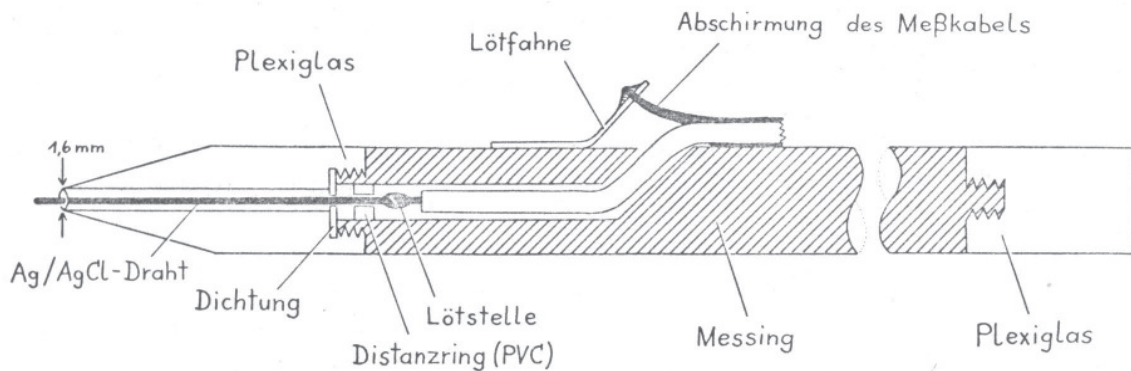


Abb. 2: Elektrodenhalter

2.3.3 Elektrodenhalter

In Abb. 2 ist der Elektrodenhalter dargestellt, in dessen vordere Öffnung die Mikroelektroden gesteckt wurden, so daß die KCl-Lösung der Elektroden in Kontakt mit dem Ag/AgCl-Draht kam. Zum Chlorieren wurde der Silberdraht (0,4 mm) mit feinem Glaspapier gesäubert und in geschmolzenes Silberchlorid getaucht (das Silberchlorid sehr langsam im Dunkeln erwärmen und abkühlen, da sonst der Tiegel platzt). Wenn keine Beschädigungen auftreten, hält dieser Überzug etwa 14 Tage (trockene Aufbewahrung über Nacht).

2.4 Versuchsaufbau

Die Versuche wurden unter dem Mikroskop (Leitz Laborlux II) bei 250facher Vergrößerung (Objektiv 10x, Okular 20x, Zwischenvergrößerung 1,25x) durchgeführt. Bei dieser Vergrößerung war es nicht möglich, sicher zu entscheiden, ob die in der Zellmitte steckende Elektrodenspitze noch einen dünnen Cytoplasmaüberzug (vgl. SADDLER 1970) besaß oder nicht; d.h. ob das Plasmalemma - oder Tonoplast -Potential gemessen wurde (vgl. Abb. 3).

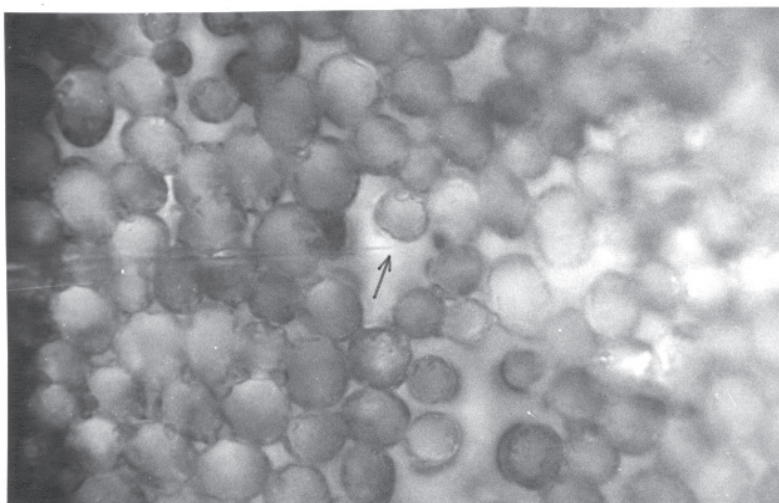


Abb. 3: Elektrode (Pfeil) vor dem Einstich in eine Oenothera-Palisadenparenchymzelle. Durchmesser einer Zelle etwa 20 μm .

Der als Faraday-Käfig gebaute, schwere Mikroskoptisch stand auf Vollgummibällen, die die Erschütterungen des Bodens dämpften. Abb. 4 zeigt die auf eine Plexiglasscheibe geklebte Versuchsküvette. Sie wurde ständig von der Versuchslösung durchströmt (Strömungsgeschwindigkeit 0,25 ml/min, Küvettenvolumen 0,16 ml, d.h. Austausch des Küvetteninhalts in 40 sec). Den Pflanzen wurde vor dem Versuch die Epidermis abgezogen und ein schmaler Streifen Gewebe mit der Rasierklinge aus dem Blatt geschnitten. Das Gewebe wurde horizontal befestigt (Abb.4). Die geerdete Mikroskoplampe diente als Lichtquelle (Lichtintensität ca. $1,5 \cdot 10^4$ kerg/cm²·sec, gemessen mit Wärmeschutzfilter im Strahlengang in Tischhöhe ohne Kondensor), die durch ein Stück schwarzes Papier im Strahlengang nach Bedarf ausgeschaltet werden konnte. Beim Einschalten des Lichtes erhöht sich die Temperatur im Lichtkegel in der Küvette um ca. 0,5°C (gemessen mit Meßheißleiter K 19b 12K, Firma Siemens), obwohl sich ein Wärmeschutzfilter im Strahlengang befand; die elektrischen Eigenschaften der Elektroden änderten sich dabei nur unwesentlich. Als Referenzelektrode in der Versuchslösung diente eine abgebrochene Glaskapillare mit ca. 0,1 mm Außendurchmesser an der Spitze, gefüllt mit 3M KCl in 2 % gereinigtem Agar.

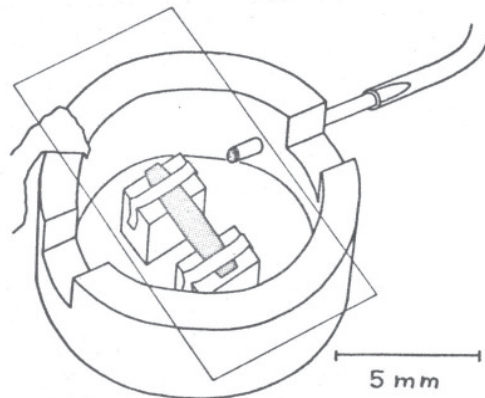


Abb. 4: Versuchsküvette, hergestellt aus einem Stück PVC-Schlauch (Innendurchmesser 8,5 mm). Die Versuchslösung fließt von rechts zu und wird links durch einen Streifen Zellstoff abgesaugt. Das Blattgewebe wird von zwei Federstahlkammern fixiert. Auf dem Küvettenrand über dem Gewebe liegt ein Deckgläschen, das mit einer Saphirnadel zurecht geschnitten wurde. Rechts und links Aussparungen für die Meß- und Referenzelektrode.

Trotz des Agars diffundierten fortlaufend geringe Mengen KCl in die Küvette; diese Verunreinigung wird jedoch von der nachströmenden frischen Versuchslösung aufgefangen. Beide Elektroden waren über die Elektrodenhalter an Leitz-Mikromanipulatoren befestigt. Mikroskop und Manipulatoren standen in dem Faraday-Käfig. Das Meßsignal wurde in einem Keithly-Differentialverstärker (Modell 604) über den Plus-Eingang (Eingangswiderstand $> 10^{14} \Omega$) vorverstärkt und mit einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet (Abb. 5). Der Schreiber (Firma Linseis) spricht in 0,8 sec über die gesamte Papierbreite an. Die Zimmertemperatur lag zwischen 21 und 26°C.

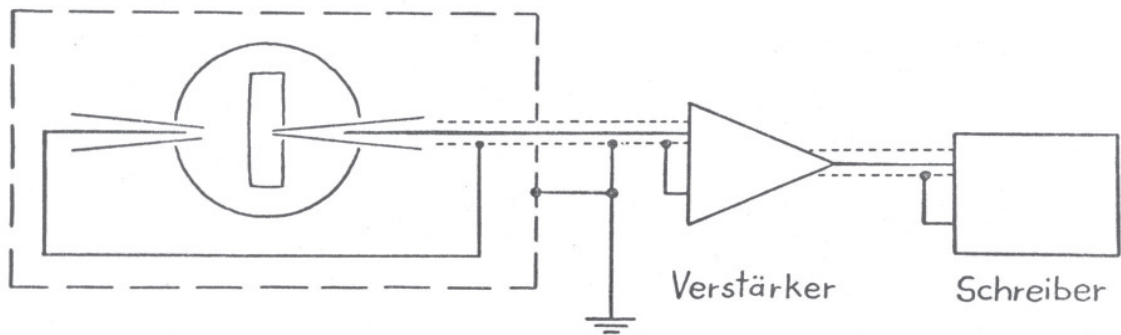


Abb. 5: Schaltbild der Versuchsanordnung. Die Abschirmungen sind durch gestrichelte Linien dargestellt. In der Küvette links die Referenzelektrode, rechts die Meßelektrode.

2.5 Ionenbestimmung

Für die Ionenbestimmungen wurde die Gerste nur 4,5 Tage im Dunkelraum bei 27°C angezogen; danach wurde sie in der Klimakammer bei 25°C und 80 % rel. Feuchte im Dunkeln gehalten. Während der Dunkelphase wurden die Proben bei indirektem Taschenlampenlicht entnommen, das durch ein gelbes Klebeband stark gedämpft war. Die Keimblätter wurden in etwa 1 cm lange Stücke geschnitten; 2 - 3 cm an der Blattspitze wurden verworfen, weil sie erheblich langsamer ergrünten und Gutationstropfen trugen. Die mindestens 12 Stunden bei 80°C getrockneten Blattstücke wurden für die Kalium- und Chloridbestimmung in 5 ml 0,5N HNO₃, für die Natriumbestimmung in 5 ml aqua bidest. eine Stunde bei Zimmertemperatur vorgequollen, dann 1,5 Stunden im Wasserbad zugedeckt gekocht (Volumenverlust < 5 %). Ein Aliquot des Extraktes wurde verdünnt und im Flammenphotometer (Eppendorf-Gerätebau, Firma Netheler & Hinz) bzw. im Chloridtitrator (Firma American Instrument Co.) untersucht.

2.6 Messung der Atmung, O₂-Entwicklung, CO₂-Fixierung und der lichtinduzierten pH-Änderungen

Zur Kontrolle der Cycloheximid-Wirkung auf die Membranpotentialänderungen wurden bei Oenothera andere photosyntheseabhängige Prozesse und die Atmung überprüft. Die Untersuchungen wurden mit den gleichen Methoden gemacht, wie sie

bei HOPE et al. (1972) beschrieben sind. Die wichtigsten experimentellen Daten sollen hier angeführt werden.

Die Blätter wurden in etwa 1 mm breite und 1 cm lange Streifen geschnitten und eine Stunde auf und in 30 ml der durchlüfteten Versuchslösung schwimmend inkubiert. Die O_2 -Entwicklung und die Atmung wurden in 5 ml APW mit einer RANK-Sauerstoffelektrode, verbunden mit einem Kompensationsschreiber bei $25^{\circ}C$ und 10 000 Lux bzw. völliger Dunkelheit gemessen.

In einer ähnlich gebauten Küvette und unter den gleichen Bedingungen wurden die apparenten lichtinduzierten Protonenfluxe bestimmt. Mit einer Einstab-pH-Elektrode (Firma Ingold) wurden in schwach gepuffertem APW (1 mM Phosphat-Puffer, pH 6,1) bei geschlossener Küvette die pH-Änderungen gemessen. Die Größe der Protonenfluxe wurde aus künstlich hervorgerufenen pH-Änderungen berechnet, die durch Zugabe von definierten KOH- und HCl-Aliquots am Ende jedes Versuchs in der Versuchsküvette ausgelöst wurden.

Unter denselben Licht- und Temperaturbedingungen wurde die $^{14}CO_2$ -Fixierung in 5 ml der folgenden Lösung gemacht: APW + 1 mM MES-Puffer + 0,25 mM $NaHCO_2$, mit 1 N HCl auf pH 6 eingestellt; die spezifische Aktivität betrug 59 mCi/mM HCO_3^- . Die Fixierungsraten wurden aus der Radioaktivität berechnet, die nach 1 min Fixierung mit anschließender Ameisensäure-Behandlung und Trocknung im Gewebe zurückblieb (Messung im Methan-Durchflußzähler).

3 Zur Messung von Membranpotentialen an Blattzellen höherer Landpflanzen

Die Vorteile, die sich aus der Wahl der höheren Landpflanzen als Untersuchungsmaterial ergeben, wurden bereits in der Einleitung (Kapitel 1) angedeutet. Hier soll nun auf die besonderen Schwierigkeiten des Materials und der Meßmethode eingegangen werden.

Für Membranpotentialmessung ist es nötig, daß die Zelle allseitig von einer elektrisch leitfähigen Lösung umgeben ist, in der sich die Referenzelektrode befindet. Bei Algenzellen, Wasserpflanzen, eingeschränkt auch bei Moosen und Wurzeln, ist diese Voraussetzung gegeben, da ihr natürlicher Lebensraum das Wasser ist. Die Mesophyllzellen höherer Landpflanzen sind zwar auch von Wasser umgeben, jedoch ist der Feuchtfilm der Zellwand und in den Interzellularen zu dünn, um in ihm eine Referenzelektrode unterzubringen. Deshalb wurde in den Versuchen dieser Arbeit das Blattgewebe in eine schwache Salzlösung (APW) gebracht, die ein genügend großes Volumen hat und den Kontakt mit dem Wasserfilm der Zelloberfläche herstellt.

Zur genauen Bestimmung der Membraneigenschaften unter natürlichen Bedingungen müßte diese Versuchslösung die gleiche Zusammensetzung haben wie der interzelluläre Wasserfilm. Das setzt eine genaue Kenntnis der Zusammensetzung der Interzellularflüssigkeit voraus; bei Oenothera befindet sich zudem noch Schleim zwischen den Blattzellen, der ebenfalls analysiert werden müßte. Als Alternative kann das Gewebe auch mit der Versuchslösung über längere Zeit (Tage) vorbehandelt werden, bis die Zellen sich in einem neuen Gleichgewicht mit dem Außenmedium befinden, wobei allerdings nicht voraussehbare Alterungseffekte auftreten können. In dieser Arbeit wurden jedoch nur Übergangsphänomene studiert oder relative Potentialmessungen gemacht, wobei es auf die absoluten Größen weniger ankam, so daß eine andere Außenlösung als das von vielen anderen Autoren benutzte APW nicht nötig war.

Die bei Landpflanzen-Blättern vorhandene Kutikula stellt ein weiteres Hindernis für elektrophysiologische Untersuchungen dar. Die hier benutzten Elektroden konnten die Kutikula nicht durchdringen, da die feine Glasspitze sich elastisch zur Seite bog oder abbrach. Deshalb wurde den Pflanzen die Epidermis abgezogen, um an tiefer gelegenen Zellen des Mesophylls die Potentiale zu messen. Das Abziehen der Epidermis ließ sich bei Oenothera und der Gerste gut durchführen.

Bei der Messung des Ruhepotentials treten Schwierigkeiten auf, die auch von anderen Autoren beschrieben wurden. Dabei hat der Durchmesser (\emptyset) der Elektroden spitze eine große Bedeutung. Einerseits führen Elektroden mit $\emptyset > 0,5 \mu\text{m}$ zur Zerstörung der Membran von Riesenaxonen und gestreiften Muskelfasern (FATT 1961), andererseits brechen selbst dickere Elektroden beim Einstich in die Pflanzenzelle leicht ab ($\emptyset > 3 \mu\text{m}$, WALKER 1955; $\emptyset < 1 \mu\text{m}$, PALLAGHY 1968; $\emptyset < 0,8 \mu\text{m}$, BENTRUP 1970; $\emptyset < 1 \mu\text{m}$, SADDLER 1970). Nach ADRIAN (1956) wird am Froschmuskel nach Abbrechen der Spitze ein um 30 mV negativeres Membranpotential gemessen. Beim Abbrechen der Spitze ($\emptyset < 1 \mu\text{m}$, SADDLER 1970) oder bei zu dicken Spitzen ($\emptyset 1-2 \mu\text{m}$, JESCHKE 1970) strömt Zellinhalt in die Elektrode. Diese Beobachtung wurde bei dickeren Elektroden (\emptyset ca. $2 \mu\text{m}$) an Oenothera-Palisadenparenchymzellen ebenfalls gemacht. Bei der Gerste konnte mit dünneren Elektroden ($\emptyset < 0,5 \mu\text{m}$) kein Eindringen von Plasmateilen festgestellt werden. Das kann auch an dem optisch weniger homogenen Untergrund des Gerstenblattgewebes liegen, der ein genaues Betrachten des Elektrodeninneren schwierig macht. Bei einschichtigen Mnium-Blättchen wurde deshalb das Eindringen von Zellinhalt in Elektroden gleicher Herstellung ($\emptyset < 0,5 \mu\text{m}$) in unserem Labor häufiger beobachtet. Nach WALKER (1955) dringt beim Anstich von Nitella Plasma in die Elektrode ($\emptyset > 3 \mu\text{m}$), bis größere Partikel die Spitze verschließen. Das Verstopfen der Elektroden spitze mit Zellbestandteilen zieht nach WALKER jedoch keine Verfälschung des Membranpotentials nach sich; er entfernte die Partikel durch Verschieben dünner Glasfäden in der Elektrode und maß dabei keine größere Potentialänderung als 3 mV.

Da eine optische Kontrolle über den Zustand der äußersten Elektroden spitze während des Versuchs meist nicht möglich ist, werden die elektrischen Eigenschaften der Elektrode gemessen (hauptsächlich der Widerstand und das Spitzenpotential), die ein Maß für die Unversehrtheit der Elektrode darstellen (ADRIAN 1956, KERN 1966, SCHANNE et al. 1968). Der Elektrodenwiderstand ist auf den sehr feinen Kanal an der Elektroden spitze zurückzuführen, der einen widerstandsfreien Stromfluß verhindert, während das Spitzenpotential seine

Ursache in der Geometrie und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Spitze hat. Über seine Entstehung gibt es verschiedene Hypothesen; in der Praxis hat eine unversehrte Elektrode in einer Lösung, deren Ionenkonzentration geringer ist als die der Elektrodenfüllung, eine negative Spannung gegenüber dem umgebenden Medium, die bei Abbrechen der Spitze verschwindet.

In APW lag das Spitzenpotential der hier benutzten, nur nach Widerständen aussortierten Elektroden zwischen - 10 und - 98 mV (Mittelwert - 43 mV, $n=105$); es wird bei steigender Temperatur zwischen 22,4 und 26,7°C knapp 2 mV/°C negativer (15 Meßwerte an 5 Elektroden). Die Spitzenpotentiale haben damit etwa die gleiche Höhe wie bei den in der Literatur beschriebenen Elektroden (ADRIAN 1956, KERN 1966). In vielen anderen Arbeiten werden die Spitzenpotentiale in Lösungen mit höherer Ionenkonzentration gemessen; dort sind sie weniger negativ, wie bereits von ADRIAN (1956) erkannt wurde. In NaCl ist das Spitzenpotential stets etwas größer als in KCl. In der Versuchslösung (APW) tritt also ein Spitzenpotential auf, das einer 1 mM NaCl-Lösung entspricht (nach KERN ca. - 60 mV; Abb. 6).

Tabelle 1 zeigt als Beispiele einige tatsächlich gemessene Spitzenpotentiale (SP) und Elektrodenwiderstände (R) vor und nach dem Anstich von Gerstenmesophyllzellen. Nach der Messung in der Zelle waren von 105 Elektroden 14 vermutlich abgebrochen (Spitzenpotential $< - 5$ mV, Abb. 25a), 15 zeigten stark schwankende Spitzenpotentiale (vermutlich mit Zellbestandteilen verklebt), während die restlichen 66 Spitzenpotentiale zwischen -5 und - 122 lagen (Mittelwert - 29 mV; vor der Messung - 43 mV). Bei 68 Elektroden stieg der Widerstand nach Herausziehen aus der Zelle über 100 Megohm an (Abb. 25c).

Diese Ergebnisse und die Beispiele in Tabelle 1 zeigen, daß sich die elektrischen Eigenschaften der Elektroden beim Messen des Membranpotentials von Gerstenmesophyllzellen in allen Fällen mehr oder weniger stark verändern. In der Literatur werden nur selten Angaben über die Elektroden-eigen-

Tabelle 1: Messung des Ruhepotentials von ergrünenden Gerstenmesophyllzellen; linke Spalte: Dunkelkontrolle, rechte Spalte 6 h Ergrünung. Die einzelnen Werte wurden in der Reihenfolge von links nach rechts gemessen bzw. berechnet: R = Widerstand der Elektrode in APW vor dem Anstich (Megohm), SP = Spitzenpotential der Elektrode in APW vor dem Anstich (-mV), RP = gemessenes Ruhepotential (-mV), $RP_{\text{Korr.}}$ = nach KERN (1966) korrigiertes Ruhepotential (-mV), SP und R = Spitzenpotential und Widerstand der Elektrode nach Herausziehen aus der Zelle. Die unterschlängelten Werte wurden aus stark schwankenden Anzeigen geschätzt.

	R	SP	RP	$RP_{\text{Korr.}}$	SP	R		R	SP	RP	$RP_{\text{Korr.}}$	SP	R
25.5.73	-	38	89	116	92	100		16	63	59	104	30	100
	60	80	75	132	48	100		40	51	70	107	40	50
	26	43	80	111	10	∞		12	20	99	113	11	24
28.5.73	24	18	107	120	28	∞		15	37	99	126	11	24
	14	24	109	126	66	∞		23	18	104	117	23	∞
	21	25	103	121	80	80		10	64	81	127	40	30
4.6.73	14	51	92	129	41	∞		22	60	83	126	40	50
	17	56	74	124	10	∞		28	57	87	128	45	28
	16	44	-	-	6	∞		28	40	98	127	30	60
	12	34	87	111	2	200		30	58	87	129	42	28
5.6.73	90	42	79	109	0	∞		30	47	82	113	22	∞
	40	10	90	97	2	∞		26	53	73	111	4	∞
	17	18	102	115	0	∞		45	21	110	125	0	∞
	80	74	44	97	0	200		65	58	84	126	5	∞

schaften nach der Potentialmessung gemacht (vgl. VOROBIEV u. KHITROV 1971). VOROBIEV u. KHITROV (1971) sehen in der Erhöhung des Spitzenpotentials eine Sensibilisierung der Elektrode für Kationen, die durch Verkleben der Spitze mit Ionenaustauschmaterial der Zelle hervorgerufen wird.

Tabelle 2: Nach KERN (1966) auf Grund der Gesamtkaliumkonzentrationen berechnetes Spitzenpotential innerhalb einer Gerstenkeimblattzelle zu verschiedenen Ergrünungszeiten.

Ergrünungszeit (h)	0	3	6	12	24
Kaliumgehalt (mmol/l Zellsaft)	119	122	117	133	161
Spitzenpotential für KCl-Lösungen der gleichen Konzen- tration (mV)	-17	-17	-17	-17	-15

Es läßt sich in den meisten Fällen nicht sagen, wann und wodurch sich die Elektrodeneigenschaften verändert haben. Deshalb wäre eine konkrete Aussage über die absolute Höhe eines Ruhepotentials nur dann möglich, wenn die Elektroden-
eigenschaften vor und nach der Messung die gleichen sind; daß auch dieses Kriterium nicht immer ausreichend ist, zeigt die in unserem Labor gemachte Beobachtung, daß sich die Höhe des Spitzenpotentials und der Widerstand einer Elektrode nicht veränderten, obwohl die Spitze deutlich abgebrochen war.

Eine voraussagbare Änderung der Elektrodeneigenschaften ist die schon erwähnte Positivierung des Spitzenpotentials beim Übergang in Lösungen mit höherer Ionenkonzentration. Da der Ionengehalt in der Zelle etwa 100 mal höher ist als im APW (Tabelle 2; Kapitel 5.3, Abb. 24), wird das Spitzenpotential weniger negativ werden. Abb. 6 zeigt diese Abhängigkeit des Spitzenpotentials von der Ionenkonzentration in NaCl- und KCl-Lösungen (aus KERN 1966). Aus diesem Diagramm kann man entnehmen, daß eine Elektrode, die in einer

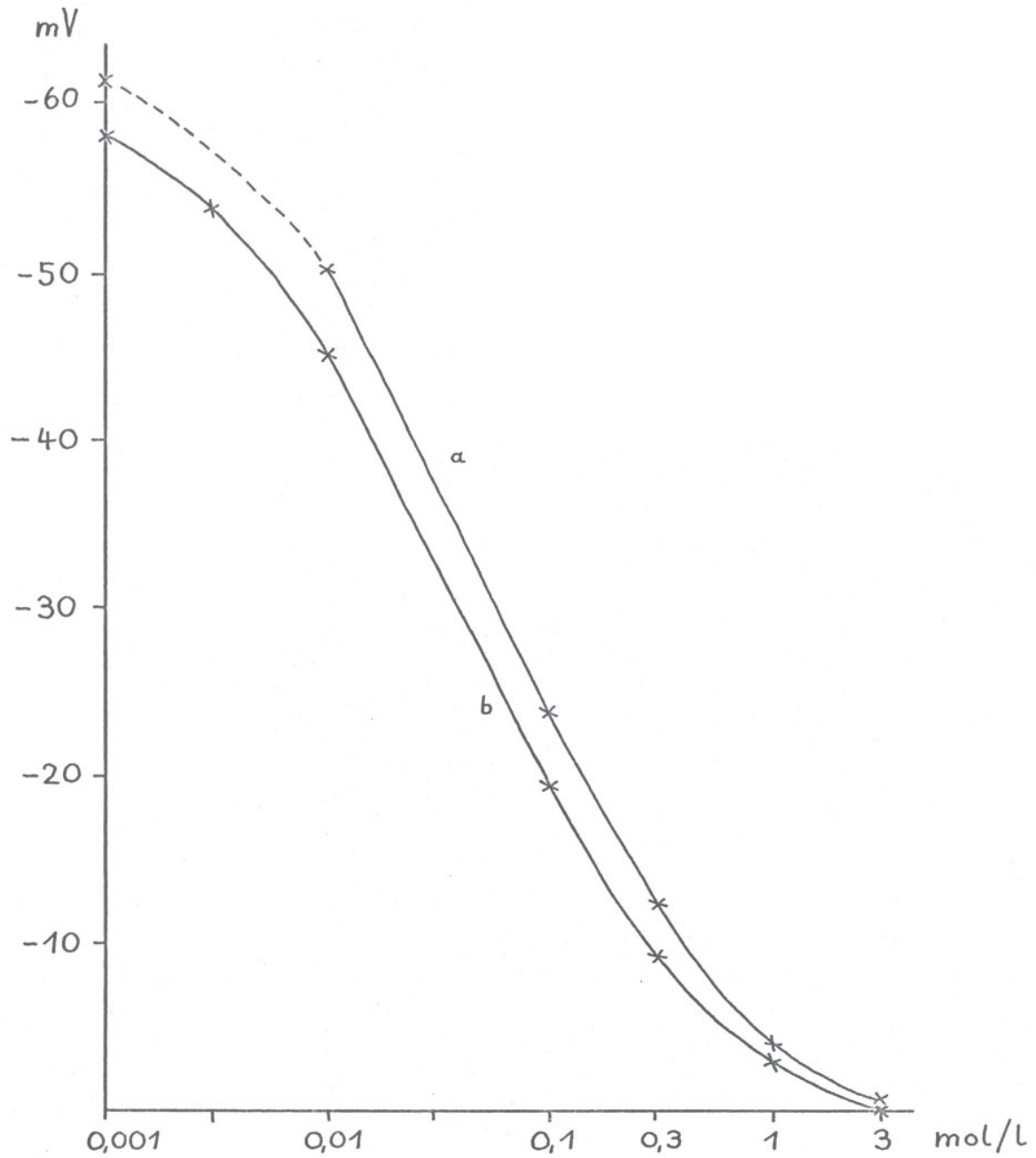


Abb. 6 (aus KERN 1966): Mittelwerte des Spitzenpotentials von Elektroden (gefüllt mit 3M KCl) in a) NaCl- und b) KCl-Lösungen. Elektrodenwiderstand: 5 - 20 Megohm.

1 mM NaCl-Lösung (APW) ein Spitzenpotential von ca. - 60mV hat, in einer KCl-Lösung von etwa 120 mM (das ist die Kaliumkonzentration des Gerstenblattextraktes, Tabelle 2) ein Spitzenpotential von etwa - 17 mV haben muß. Ist das Spitzenpotential einer Elektrode in APW nun nicht - 60 mV, so kann mit dieser Verhältniszahl (60 : 17 bzw. 60 : 15, s. Tabelle 2) und dem in APW gemessenen tatsächlichen Spitzenpotential (SP_{APW}) das neue Spitzenpotential (SP_{innen} in Abb. 7) innerhalb der Zelle berechnet werden.

In Abb. 6 ist die Folge dieser Spitzenpotentialänderung aufgetragen: das gemessene Ruhepotential (RP) ist (numerisch) kleiner als das tatsächliche Ruhepotential ($RP_{korr.}$). Mit Hilfe der gezeigten Rechnung läßt sich ein genauerer Wert für das Ruhepotential angeben. Es wurde schon erwähnt, daß diese Werte nicht die absolute Höhe des Ruhepotentials darstellen können, da sich die Zellen nicht in einem Gleichgewicht mit der umgebenden Versuchslösung befinden.

Neben dieser Korrektur besteht die Möglichkeit, nur Elektroden mit standardisierten Eigenschaften zu benutzen. Nach BERG u. BONKE (pers. Mitteilung) verhalten sich die hier benutzten Elektroden mit Spitzenpotentialen bis zu - 12 mV (in Frosch-RINGER-Lösung $\hat{=}$ - 35 mV in APW) statistisch signifikant gleich bei der Messung des Membranpotentials von Muskelfasern (M. sartorius) des Grasfrosches Rana temporaria. Andere Autoren (z.B. ADRIAN 1956, PALLAGHY 1968) verwenden nur Elektroden mit Spitzenpotentialen in RINGER-Lösung bis zu - 5 mV (= - 15 mV in APW), d.h. es wird auf eine Korrektur verzichtet, die wegen des relativ geringen Unterschiedes in den Ionenkonzentrationen Außenmedium-Zellinneres ohnehin nicht sehr groß ist.

Für die Interpretation der Meßergebnisse des Ruhepotentials der Gerste (Kapitel 5.4 und 5.5) müssen also folgende Annahmen gemacht werden: 1) die Meßelektrode ändert die Geometrie und die Elektrolytzusammensetzung ihrer Spitze während des Anstichs der Zelle nicht, d.h. die beobachteten Änderungen der Elektrodeneigenschaften treten erst beim Herausziehen aus der Zelle auf, 2) die Ionenkonzentration

des Blattextraktes entspricht der tatsächlichen Ionenkonzentration am Ort der Elektrodenspitze in der Zelle, 3) die Elektrode steckt stets in dem gleichen Zellkompartiment, d.h. sie dringt gleich in die Vakuole vor, ohne einen Cytoplasmasaum vor sich her zu schieben (vgl. SADDLER 1970). Unter diesen Voraussetzungen ist auch eine Korrektur des gemessenen Membranpotentials nach KERN (1966) möglich.

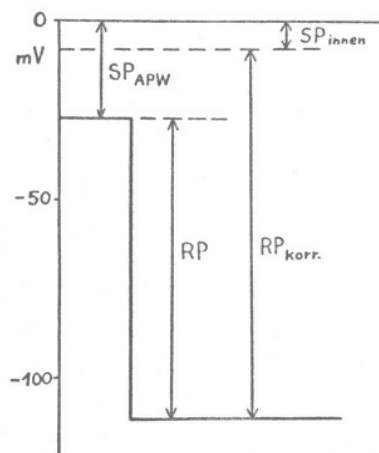


Abb. 7: Korrektur des in Abb. 25b gemessenen Membranpotentials (RP) auf Grund des veränderten Spitzenpotentials der Elektrode beim Eintritt in die Zelle. Zur Berechnung des Spitzenpotentials innerhalb der Zelle (SP_{innen}) s. Text. SP_{APW} = Spitzenpotential in der Versuchslösung, $RP_{\text{korr.}}$ = korrigiertes Ruhepotential (nach KERN 1966).

4 Versuche mit panaschierten Oenothera-Mutanten

Um die Auswirkungen der Plastom-Mutationen von Oenothera auf die Membranpotentialeffekte erkennen zu können, müssen die Effekte an dem nicht-mutierten Gewebe bekannt sein. Deshalb wurden zunächst die lichtinduzierten Membranpotentialänderungen an grünen Kontrollpflanzen (Kapitel 4.1.1) untersucht.

Vorübergehende Änderungen des Membranpotentials bei Beleuchtungswechsel sind im Pflanzenreich weit verbreitet, wenn auch mit sehr unterschiedlichen Erscheinungsformen (JESCHKE 1970). Bei höheren Landpflanzen wurden sie intrazellulär bisher an Vertretern der Chenopodiaceen (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969) und bei Peperomia metallica (BULYCHEV et al. 1972a) nachgewiesen. Zur Bestätigung, daß es sich bei Oenothera um die gleichen Phänomene wie bei anderen Landpflanzen handelt (vgl. Kapitel 1), wurde in Kapitel 4.1.2 der Einfluß des langwelligen Lichtes untersucht.

Die panaschierten Blätter von Oenothera sind gut geeignet, um die in der Literatur beschriebene Übertragung der lichtinduzierten Membranpotentialeffekte in andere Zellen (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969, VREDENBERG 1969) weiter zu vertiefen. Mit diesem System ist es auch möglich, die elektrische Koppelung der Zellen (z.B. SPANSWICK 1972) zu studieren, ohne dabei zusätzliche Eingriffe in die elektrischen Eigenschaften der Zellen zu machen (Kapitel 4.2.2).

In diesem Zusammenhang muß das Konzept des symplasmatischen Kontinuums erwähnt werden, welches ARISZ (1956) mit seinen Versuchen belegte. Nach diesen Vorstellungen setzt sich das Cytoplasma jeder Zelle in dem Cytoplasma der Nachbarzelle fort; die Barriere der Zellwand wird dabei durch die Plasmodesmen übergangen. Für den Ionentransport von Zelle zu Zelle stellen die Plasmodesmen deshalb die Zone des geringsten Widerstandes dar (TYREE 1970).

Entscheidend für die Frage der elektrischen Koppelung benachbarter Zellen ist die Struktur der Plasmodesmen. ROBARDS (1971) stellt die beiden Haupttheorien über die Plasmodesmenfeinstruktur gegenüber: nach der einen Theorie nähert sich das endoplasmatische Retikulum (ER) dicht der Plasmodesmenöffnung, verschließt aber mit seinen Membranen die Pore, während nach der zweiten Theorie das ER von einer Zelle zur anderen durch die Plasmodesmen hindurchreicht.

Nachdem sich eine gute elektrische Verbindung zwischen grünen und weißen Zellen der Oenothera-Mutanten herausgestellt hatte, wurde deshalb die Feinstruktur von Oenothera

unter besonderer Berücksichtigung der Plasmodemesmen untersucht. Bereits vorliegende Arbeiten über die Ultrastruktur der Oenothera-Mutanten (DOLZMANN 1968) konnten dazu nicht benutzt werden, da sie sich mit anderen Problemstellungen beschäftigen.

4.1 Grüne Kontrollpflanzen

4.1.1 Lichtinduzierte Oszillationen des Membranpotentials

Bei Einschalten des Lichtes wird das Membranpotential einer Oenothera-Palisadenparenchymzelle zunächst innerhalb von einigen Sekunden negativer (hyperpolarisiert, Abb. 8); nach Erreichen eines Maximalwertes (< 4 mV) setzt eine Depolarisierung ein, die nach etwa einer Minute ebenfalls einen Maximalwert durchläuft (im Mittel 26 mV positiver als das Ruhepotential zum Zeitpunkt der Belichtung, $n = 15$); nach längerer Zeit stellt sich das Potential wieder auf einen Wert ein, der sich nicht oder nur wenig von dem Ruhepotential vor der lichtinduzierten Oszillation unterscheidet. Eine genauere Untersuchung über die absolute Höhe des Membranpotentials wurde nicht gemacht, da das Spitzenpotential der Elektroden vor und nach der Messung schon wegen des Schleims in den Interzellularen häufig unterschiedlich war (vgl. Kapitel 3).

Schaltet man das Licht aus, so läuft der Vorgang in umgekehrter Richtung mit etwas anderer Kinetik ab: die rasch einsetzende Depolarisierung erreicht ihr Maximum nach mehr als 10 Sekunden (Mittelwert 10 mV, $n = 21$), die Hyperpolarisierung ihr Maximum (Mittelwert 23 mV, $n = 23$) nicht vor zwei Minuten, um danach wieder in mehr als 15 Minuten auf das Ruhepotential abzusinken. Der Lichteffekt ist intensitätsabhängig: eine Erhöhung der Intensität während der Lichtphase führt zu einem weiteren, kleinen Lichteffekt (Abb. 10).

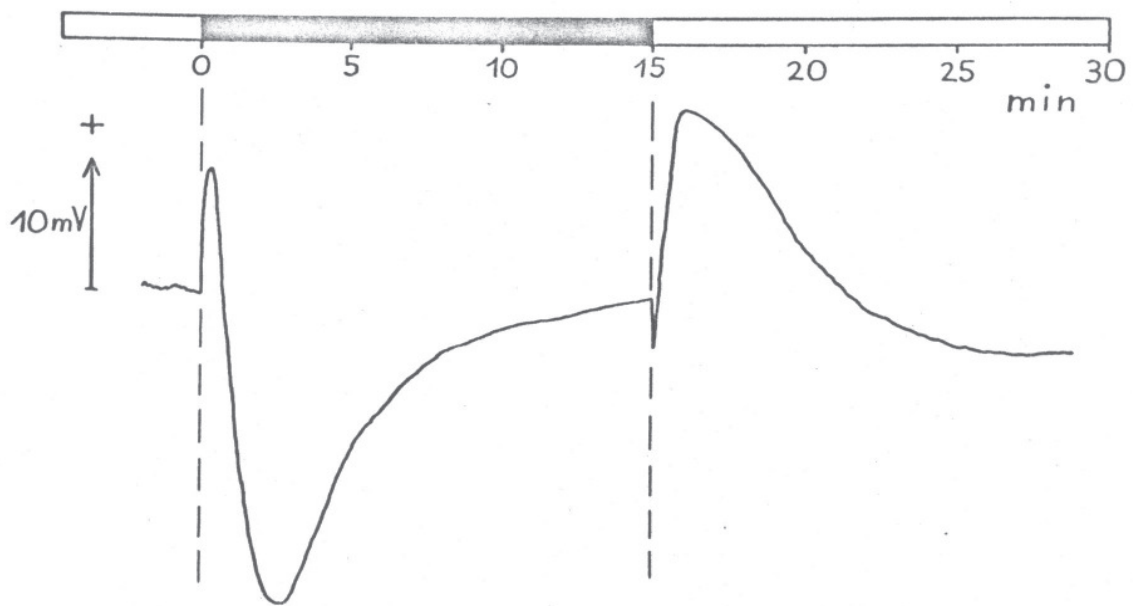


Abb. 8: Lichtinduzierte Oszillationen des Membranpotentials einer grünen *Oenothera*-Palisadenparenchymzelle. Der Nullpunkt liegt in dieser wie in allen folgenden Abbildungen links oben. An der Zeitachse ist das jeweilige Lichtprogramm angegeben: weiß = Dauerlicht, schwarz = Dauerdunkel.

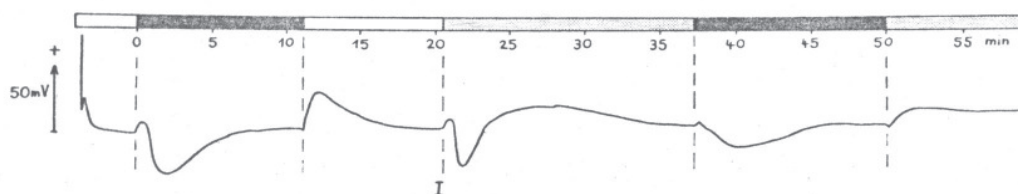


Abb. 9: Wirkung des Lichtes ($\lambda > 670$ nm) von Filter I (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969) auf das Membranpotential einer grünen *Oenothera*-Palisadenparenchymzelle (Kontrollpflanze). Lichtprogramm (wie in den folgenden Abbildungen): weiß = Dauerlicht, grau = gefiltertes Dauerlicht, schwarz = Dauerdunkel.

4.1.2 Wirkung des langwelligen Lichtes

Die Photosyntheseabhängigkeit eines lichtinduzierten Prozesses kann man z.B. durch einen Vergleich des Photosynthespektrums mit dem Aktionsspektrum des Effektes nachweisen. Das Aktionsspektrum erhält man, wenn man die

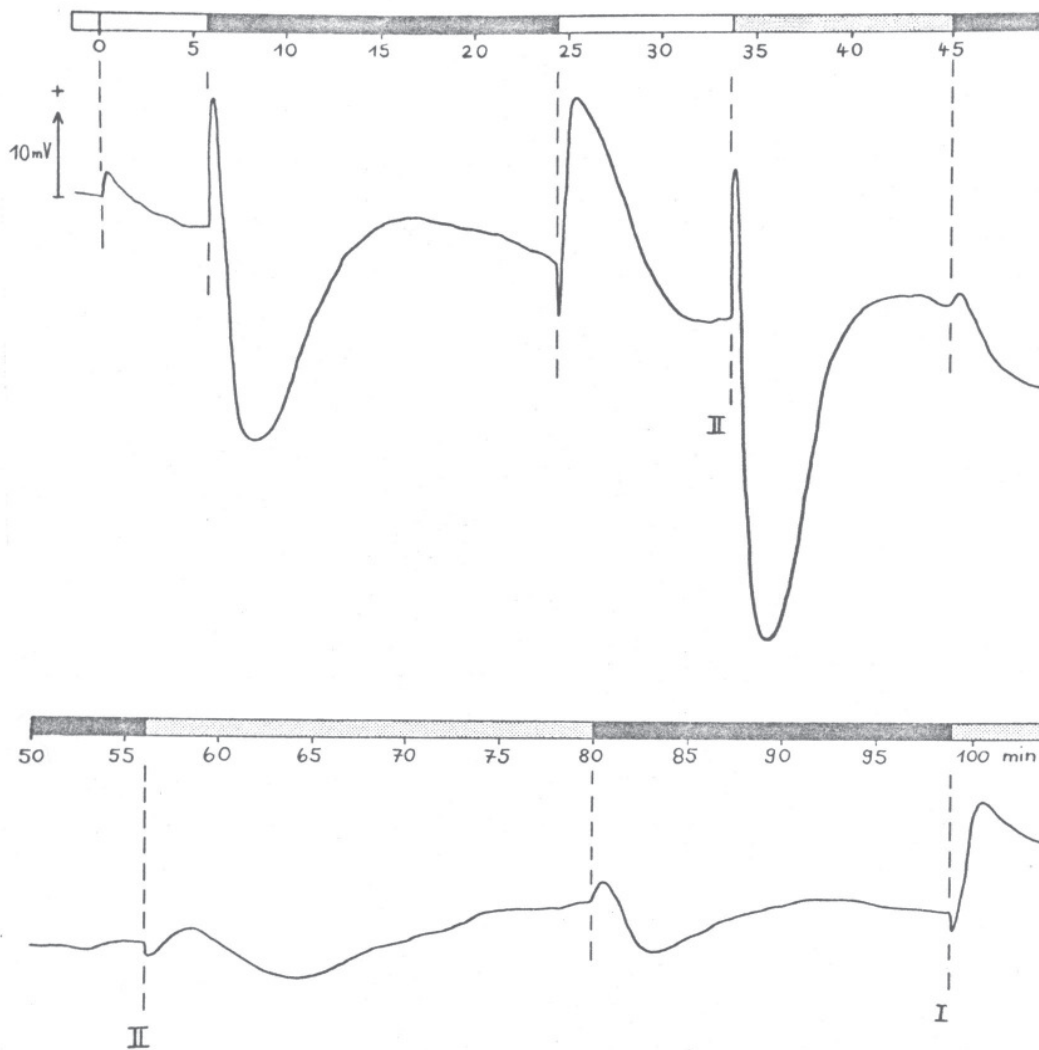


Abb. 10: Einfluß von Lichtintensität und Filter II ($\lambda > 705$ nm, LÜTTGE u. PALLAGHY 1969) auf das Membranpotential einer grünen Oenothera-Palisadenparenchymzelle (Kontrollpflanze). Bei 0 min wurde die Lichtintensität von ca. $1,2 \cdot 10^4$ auf ca. $2,9 \cdot 10^4$ kerg/cm².sec erhöht.

Pflanze mit Licht verschiedener Wellenlängen bestrahlt und die Größe des Effektes bei den einzelnen Wellenlängen mißt. Man setzt voraus, daß das Licht dabei am Entstehungsort des lichtinduzierten Prozesses absorbiert wird. Aktionsspektren für die lichtabhängigen Membranpotentialänderungen gibt es z.B. von der Grünalge Acetabularia crenulata (SCHILDE 1966),

der Rotalge Griffithsia setacea (HROM 1971b) und der höheren Pflanze Peperomia metallica (BULYCHEV et al. 1972a).

Zur Untersuchung der Lichteffekte wurden dieselben Filter benutzt, die von LÜTTGE u. PALLAGHY 1969 benutzt wurden und die MacROBBIE (1965) beschrieben hatte: Filter I ($\lambda > 670\text{nm}$) soll Photosystem I und II anregen, Filter II ($\lambda > 705\text{nm}$) nur noch Photosystem I; Filter III ($\lambda > 730\text{nm}$) läßt kein Photosystem mehr arbeiten. Da bei zunehmender Wellenlänge die Intensität des gefilterten Lichtes abnimmt, andererseits aber die Effekte intensitätsabhängig sind (OSMOND et al. 1969, GRADMANN 1970), könnte ein Ausbleiben der Effekte bei höheren Wellenlängen auf eine Intensitätsverminderung zurückgeführt werden. Deshalb wurden Filter I und II mit Neutralfiltern gedämpft, so daß das Licht mit Filter I die geringste, mit Filter III sogar die höchste Intensität aufwies.

Das Membranpotential reagiert auf das Einbringen der Filter in den Strahlengang mit Oszillationen, die wie der Dunkeleffekt ablaufen (Abb. 9 - 11). Hierbei spielt sicher die Intensitätsverminderung des Lichtes eine entscheidende Rolle. Das An- und Abschalten des Lichtes ergibt in Anwesenheit von Filter I einen etwas schwächeren und langsameren Effekt als bei weißem Licht (Abb. 9 u. 10).

Bei Beleuchtung der Zellen mit Filter II wurden bei normaler Lichtintensität keine Effekte mehr erhalten; bei höheren Intensitäten tritt jedoch wieder eine Antwort auf Beleuchtungswechsel auf, die allerdings - ähnlich wie bei Filter I - ebenfalls schwächer und langsamer ist als bei weißem Licht (Abb. 10). Filter III unterbindet jede Lichtreaktion (Abb. 11).

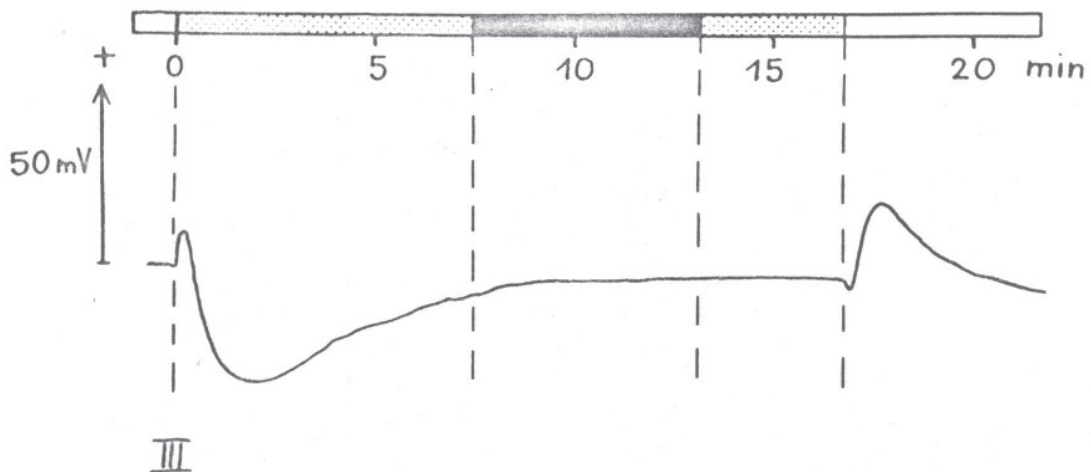


Abb. 11: Wirkung des Lichtes ($\lambda > 730$ nm) von Filter III (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969) auf das Membranpotential einer grünen Oenothera-Palisadenparenchymzelle (Kontrollpflanze).

4.2 Panaschierte Blätter

Die gelblich-weiße Färbung einzelner Bezirke von panaschierten Oenothera-Blättern ist die Folge von Defekten, die in dem Erbgut der Plastiden (Plastom) fixiert sind. Die hier verwendeten Mutanten (Geschenk von Prof. STUBBE, Düsseldorf) Oenothera albicans · hookeri IV/II α und IV/II γ zeigen in bestimmten Photosynthesereaktionen verminderte oder fehlende Leistungen. Die bisher bekannten Ergebnisse über die Physiologie und Feinstruktur der Mutanten sind im Folgenden kurz angeführt.

Die Pigmente der Mutanten sind qualitativ gleichwertig denen des Wildtyps; die ATP-Produktion ist ausreichend, nicht aber die Bereitstellung von reduzierten Pyridinnukleotiden (HALLIER 1968).

Bei beiden Mutanten ist der Elektronentransport der Photosynthese beeinträchtigt: die Mutante mit dem Plastom II α zeigt eine verminderte Aktivität des Photosystems I, bei der γ -Mutante dagegen ist das Photosystem II beschädigt (FORK u. HEBER 1968). Die Aktivität des PS II ist bei der α -Mutante viel höher als die des PS I; das äußert sich darin, daß die α -Mutante im Licht deutlich weniger Sauer-

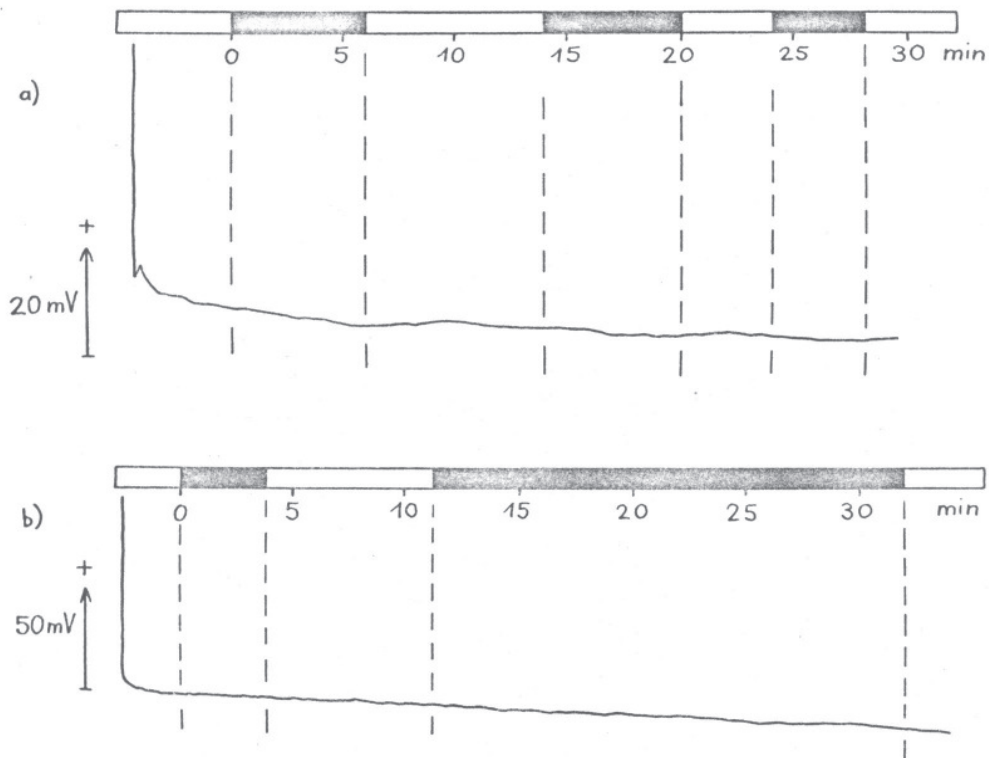


Abb. 12: Keine Wirkung des Lichtes auf das Membranpotential einer Palisadenparenchymzelle in dem weißen Blattbezirk a) der α -Mutante (Block im PS I), b) der γ -Mutante (Block im PS II) von Oenothera.

stoff verbraucht als im Dunkeln (HALLIER et al. 1968, eigene Kontrollen) oder sogar den O_2 -Verbrauch der Atmung kompensieren kann (LÜTTGE u. BALL 1971), während die γ -Mutante im Dunkeln wie im Licht die gleiche negative Stoffbilanz hat.

DOLZMANN (1968) untersuchte die Feinstruktur der Mutanten und stellte dabei Unterschiede in dem Aufbau der Chloroplasten fest: die γ -Mutante zeigt erhebliche Reduktionserscheinungen der Grana und Veränderungen der Thylakoide. Neben diesen stark veränderten Plastiden finden sich mit allen Übergangsstadien auch verhältnismäßig gut erhaltene Chloroplasten in dem mutierten Gewebe. Bei der α -Mutante dagegen sind sämtliche Chloroplasten gleich strukturiert, wobei ihr Aufbau dem von normalen grünen Chloroplasten am nächsten kommt.

4.2.1 Vollkommen mutierte Bezirke

In den gelblich-weißen Bezirken der Oenothera-Mutanten albicans . hookeri IV/II γ , in denen auch bei mikroskopischer Kontrolle keine grünen Zellen zu sehen waren, fehlen die lichtinduzierten Oszillationen des Membranpotentials völlig (Abb. 12b). Auch das Membranpotential von weißen Zellen der α -Mutante reagiert nicht auf Beleuchtungswechsel (Abb. 12a), obwohl hier gewisse Effekte erwartet wurden, da nach den bisherigen Vorstellungen in der Literatur (s. Kapitel 4.5) die Lichteffekte an dem Elektronentransport des Photosystems II gekoppelt sein sollten, der bei der α -Mutante noch intakt ist.

4.2.2 Teilmutierte und weiß-grüne Bezirke

In den frühen Blattenwicklungsstadien der Oenothera-Mutanten kann es zur Entmischung des mütterlichen und väterlichen Plastoms kommen. Das führt dazu, daß verschiedene Gewebeschichten oder Blattbezirke entweder intakte grüne oder gelbliche Plastiden haben, die nur das mutierte Plastom enthalten. Je nach Lage der Gewebesorten zueinander unterscheidet man Periklinal- (Abb. 13) und Sektorialchimären (Abb. 14) (STUBBE 1955).

Befindet sich eine mutierte, gelbliche Zelle entweder in direktem (Abb. 13a) oder indirektem (Abb. 13b, 14) Kontakt mit grünen, nicht mutierten Zellen, so läßt sich eine Wirkung des Lichtes auf das Membranpotential der mutierten Zelle nachweisen (Abb. 13 und 14), d.h. daß der Lichteffekt, der nur in den grünen Zellen entstehen kann (s.oben), in die mutierten Zellen übertragen wird. Die Anwesenheit eines grünen Blattstücks in der Küvette, das von dem rein weißen Gewebe getrennt war, reicht nicht aus, um die Lichteffekte in dem mutierten Blatteil zu induzieren.

Bei dem Versuch in Abb. 13a war die obere Schicht des Palisadenparenchyms mutiert, in Abb. 13b bestand nur ein Teil des Schwammparenchyms aus grünen, nicht mutierten Zellen, der Rest des Gewebes enthielt nur das bleiche Plastom II γ . Die Lichteffekte stammen in Abb. 13a also aus den direkt

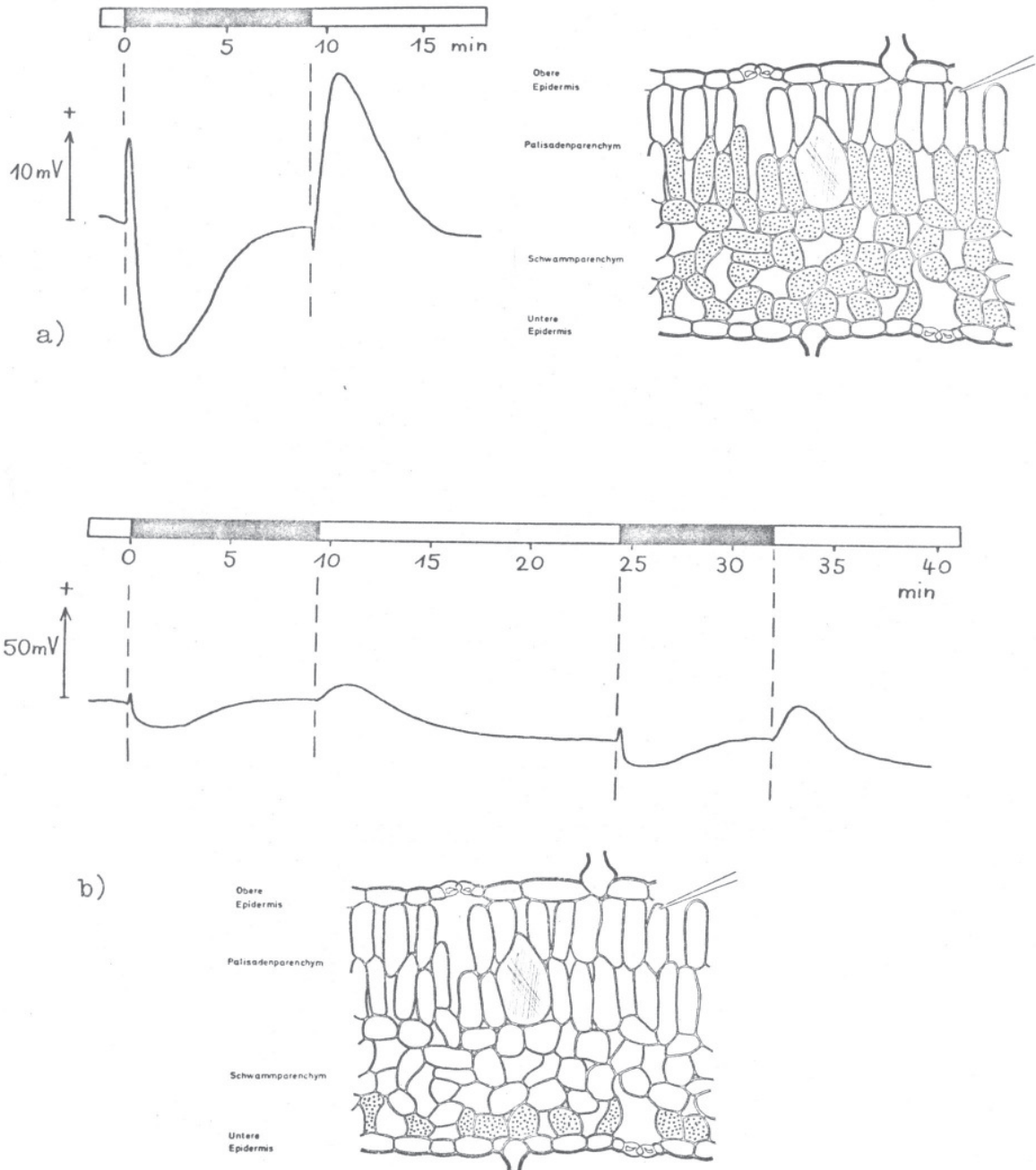


Abb. 13: Wirkung des Lichtes auf das Membranpotential einer weißen Palisadenparenchymzelle von Oenothera hookeri. albicans IV/II χ . Die Blattbezirke sind nicht völlig mutiert: die punktierten Zellen in den histologischen Übersichtsskizzen stellen grüne Zellen (Plastom IV) dar; oben rechts ist der Sitz der Elektrode angedeutet.

benachbarten Zellen, während sie in Abb. 13b über mehrere Zellen fortgeleitet werden mußten.

Auch über weitere Strecken wird das Signal der Lichtwirkung übertragen: in Abb. 14 war die nächste grüne Zelle etwa 0,89 mm von der Zelle entfernt, deren Membranpotential registriert wurde. In dieser durch Verschieben des Kreuztisches gemessenen Strecke liegt zudem noch ein Blattnerv.

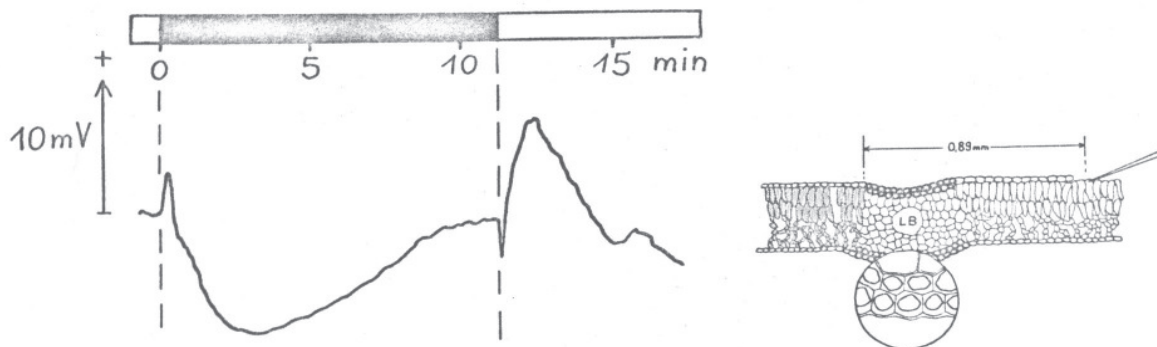


Abb. 14: Wirkung des Lichtes auf das Membranpotential einer Palisadenparenchymzelle im rein-weißen Bezirk eines panaschierten Blattes von Oenothera hookeri . albicans IV/II γ . In der histologischen Übersichtsskizze ist der Sitz der Elektrode und der Abstand zu dem grünen Bezirk des Blattes angegeben. Der Blattnerv ist von einer doppelten Kollenchymschicht bedeckt, die stärker vergrößert eingezeichnet wurde. LB = Leitbündel.

Nach PITMAN et al. (1971) ist das Membranpotential von Gerstenwurzelzellen, die gleich neben der Schnittfläche liegen, erst nach 11 Stunden auf dem gleichen Niveau wie bei den weiter innen liegenden Zellen (vgl. auch MACKLON u. HIGINBOTHAM 1968, SPANSWICK 1970). Um nachzuprüfen, ob diese Wundeffekte die Oszillationen und deren Übertragung nachteilig beeinflussen, wurde in einem Kontrollversuch ein weiß-grünes Blattstück (wie in Abb. 14) 17 Stunden über Nacht in fließendem APW gealtert; trotzdem ließen sich lichtinduzierte Oszillationen in dem weißen Teil feststellen.

Die Geschwindigkeit der Weiterleitung des Signals scheint recht hoch zu sein. In den Abbildungen 13 und 14 ist keine Verzögerung der Licht- oder Dunkeleffekte erkennbar, selbst bei der relativ großen Entfernung von der nächsten grünen Zelle in Abb. 14. Die Registrierung der Oszillationen mit höheren Geschwindigkeiten des Papiervorschubs am Schreiber zeigt vielleicht eine kleine Verzögerung von einer halben Sekunde, wenn die Elektrode in einer Zelle des oberen Palisadenparenchyms steckte und nur das Schwammparenchym grüne Zellen besaß (Abb. 15a). im Gegensatz zu den rein grünen Kontrollpflanzen (Abb. 15b). Eine genaue Analyse wird dadurch erschwert, daß die Oszillationen gelegentlich mit einem sigmoiden Verlauf beginnen und der Zeitpunkt ihres Einsetzens deshalb nicht exakt bestimmt werden kann.

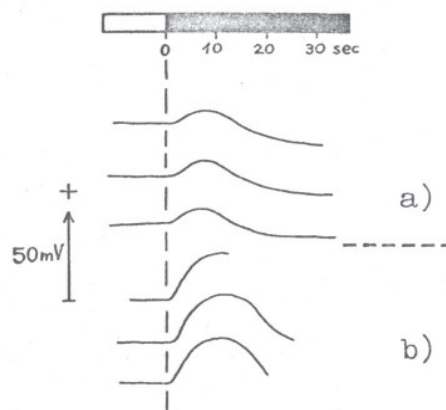


Abb. 15: Höhere zeitliche Auflösung des Dunkeleffektes bei Oenothera: a) panaschierter Blattbezirk (wie in Abb.11b), b) Kontrollpflanze (rein grün).

4.3 Verteilung der Plasmodesmen in den panaschierten Blättern

Für die Weiterleitung elektrischer Signale in Pflanzenzellen spielt die Anzahl der Plasmodesmen zwischen den benachbarten Zellen eine Rolle (GOLDSMITH et al. 1972, SPANSWICK 1972); dabei fanden GOLDSMITH et al. (1972) - trotz guter methodischer Voraussetzungen bei der Messung des Membranpotentials - keine elektrische Koppelung zwischen benachbarten Zellen der Hafer-Koleoptile, während SPANSWICK (1972)

an dem gleichen Objekt zu dem gegenteiligen Ergebnis kam. GOLDSMITH et al. (1972) sahen den Grund für die fehlende Leitfähigkeit in der geringen Zahl der Plasmodesmen in der Avena-Koleoptile.

Eine Untersuchung über die Größe und Zahl der Plasmodesmen bei Oenothera sollte klären, ob hier wegen der guten Leitfähigkeit der Effekte vielleicht eine besonders hohe Plasmodesmenhäufigkeit vorlag.

Dazu wurden weiße und grüne Blattstreifen der γ -Mutante in Glutaraldehyd/ OsO_4 fixiert und als Ultradünnschnitte nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat elektronenoptisch untersucht.

Um die Untersuchungen an Oenothera mit den Angaben aus der Literatur vergleichen zu können (da die Plasmodesmenhäufigkeit hier nach einer anderen Methode bestimmt wurde, s.u.), wurden zusätzlich Avena-Koleoptilen mit denselben Methoden wie bei Oenothera untersucht. Die Koleoptilen entsprachen dabei in Alter und Größe dem Material von O'BRIEN u. THIEMANN (1967).

Die Plasmodesmen von Oenothera sind anscheinend ähnlich gebaut wie bei der Hafer-Koleoptile (O'BRIEN u. THIEMANN 1967): gelegentlich wurden zwei Plasmodesmen in einer H-förmigen Anordnung mit einer gemeinsamen Höhle in der Wandmitte gefunden. In Abb. 16b ist außerdem deutlich erkennbar, daß endoplasmatisches Retikulum in die Plasmodesmen hineinreicht.

In der Literatur wird zur Bestimmung der Plasmodesmenhäufigkeit normalerweise die Summe der Querschnittsflächen aller Plasmodesmen auf die Zelloberfläche bezogen. Das scheint bei Geweben mit kleinen Interzellularräumen hinreichend genau zu sein. Bei ausdifferenzierten Blattgeweben treten dabei zwei Schwierigkeiten auf: die Oberfläche z.B. einer Schwammparenchymzelle ist nur schwer bestimmbar, zum anderen sind die Interzellularräume groß, so daß die Zellen nur eine relativ geringe gemeinsame Zellwandoberfläche mit den Nachbarzellen und dadurch eine niedrigere Zahl von Plasmodesmen bezogen auf die Gesamtoberfläche haben. Deshalb wurde in der folgenden Auswertung der Durchmesser der Plasmodesmen be-

stimmt, auf einer Anzahl von Schnittbildern (Primärvergrößerung 1650:1, Sekundärvergrößerung 3,5:1) die Länge der gemeinsamen Zellwände von benachbarten Zellen gemessen und die darin sichtbaren Plasmodiesmen gezählt (Abb. 16). Die gesamte ausgemessene Zellwandlänge wurde gleich 100 % gesetzt und der Durchsatz aller gefundenen Plasmodiesmen durch die Zellwand in % der Wandlänge errechnet. Dabei ergibt sich folgendes (Tabelle 3):

Tabelle 3: Größe und Verteilung von Plasmodiesmen in Avena-Koleoptilen und in grünen und weißen Blattstücken von Oenothera hookeri . albicans IV/II γ . Auswertung der Elektronenmikrographien.

	Avena- Koleoptile	Oenothera IV/II	
		grüne Bezirke	weiße Be- zirke
Mittlerer Durchmesser eines Plasmodiesmos (\AA)	145 (n=16)	300 (n=11)	280 (n=5)
Gesamtzahl der Plasmo- desmen (auf n ausge- werteten Photos)	132 (n=14)	52 (n=7)	55 (n=10)
Summe der Plasmodiesmen- durchmesser (= Gesamt- durchsatz durch die ge- meinsamen Zellwände) (μm)	1,98	1,56	1,54
Anzahl der gemeinsamen Zellwände	116	41	31
Auf n Photos ausgemes- sene Gesamtlänge der gemeinsamen Zellwände (= 100 %) (μm)	1410 (n=14)	435 (n=7)	372 (n=10)
davon % Plasmodiesmen	0,14	0,36	0,41

Zwischen den grünen und den weißen Bezirken der Oenothera-Panaschüre bestehen keine grundlegende Unterschiede in der Größe und Zahl der Plasmodiesmen. Im Vergleich zu der Avena-Koleoptile ist die Durchbrechung der Oenothera-Zellwände mit Plasmodiesmen etwa 2 - 3 mal so groß.

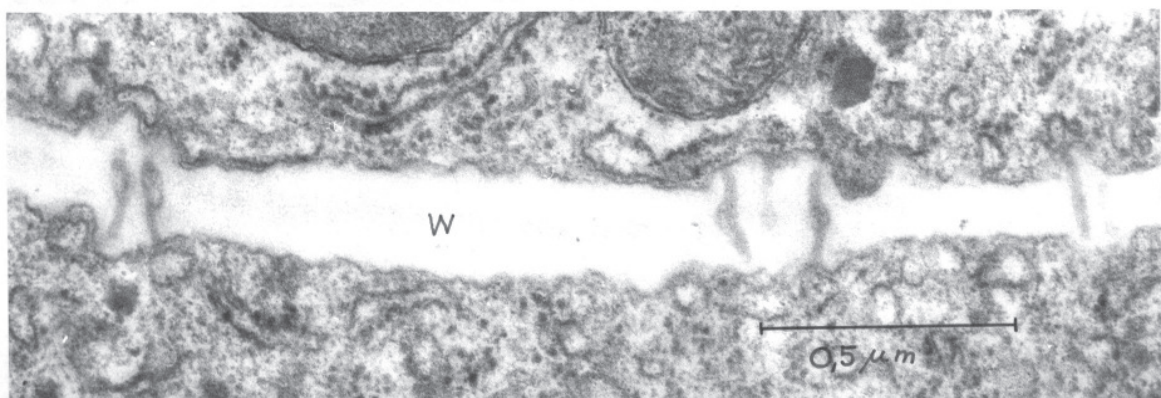
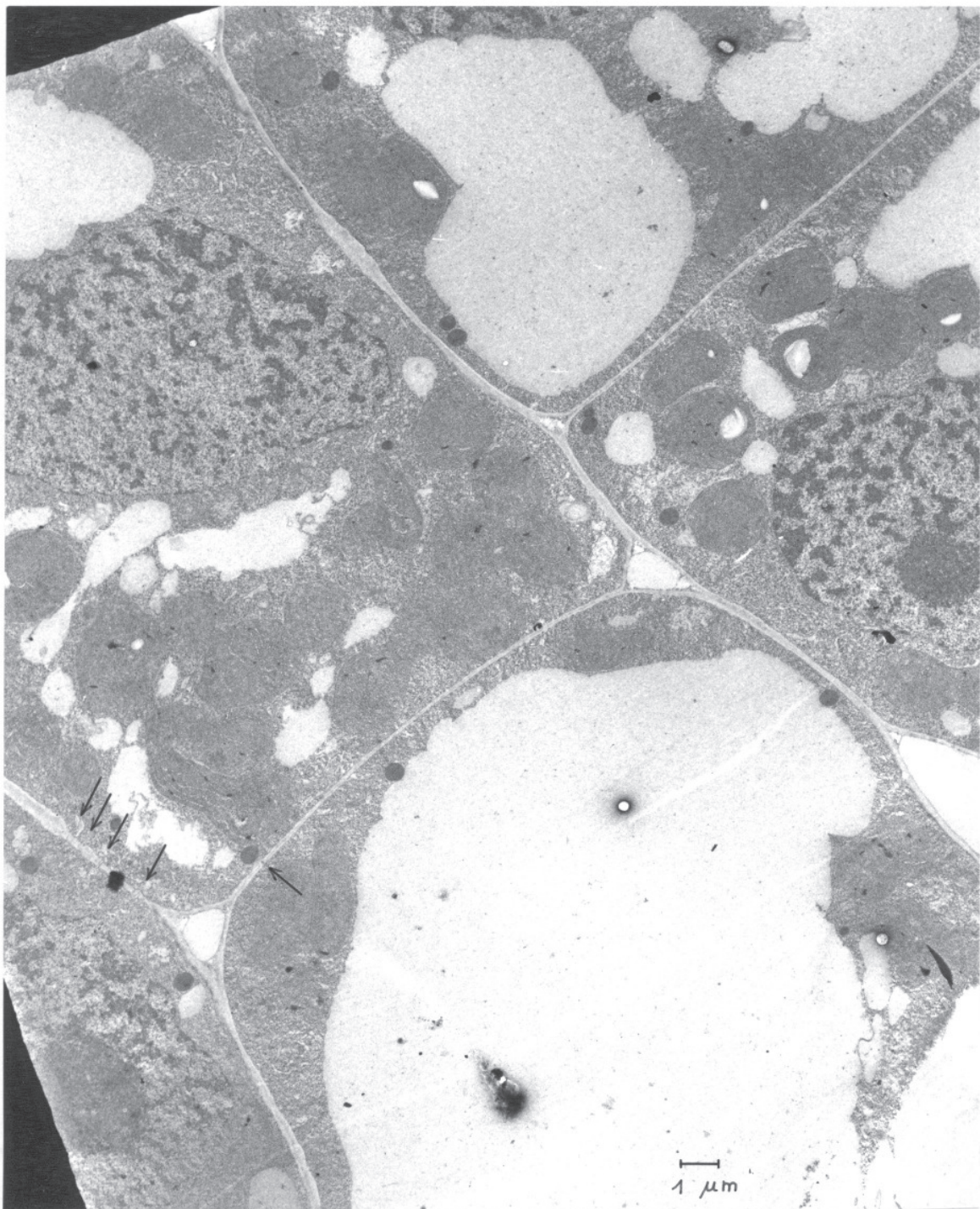


Abb. 16 a

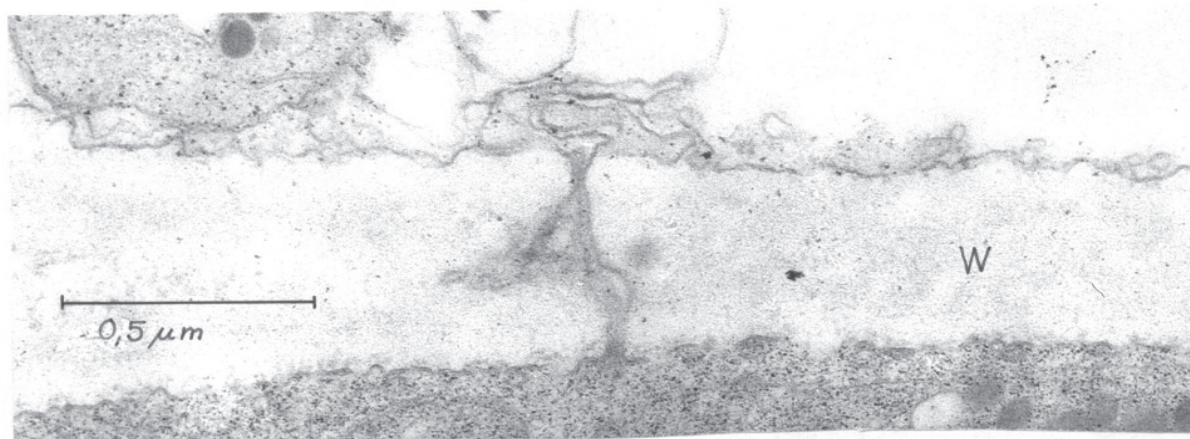
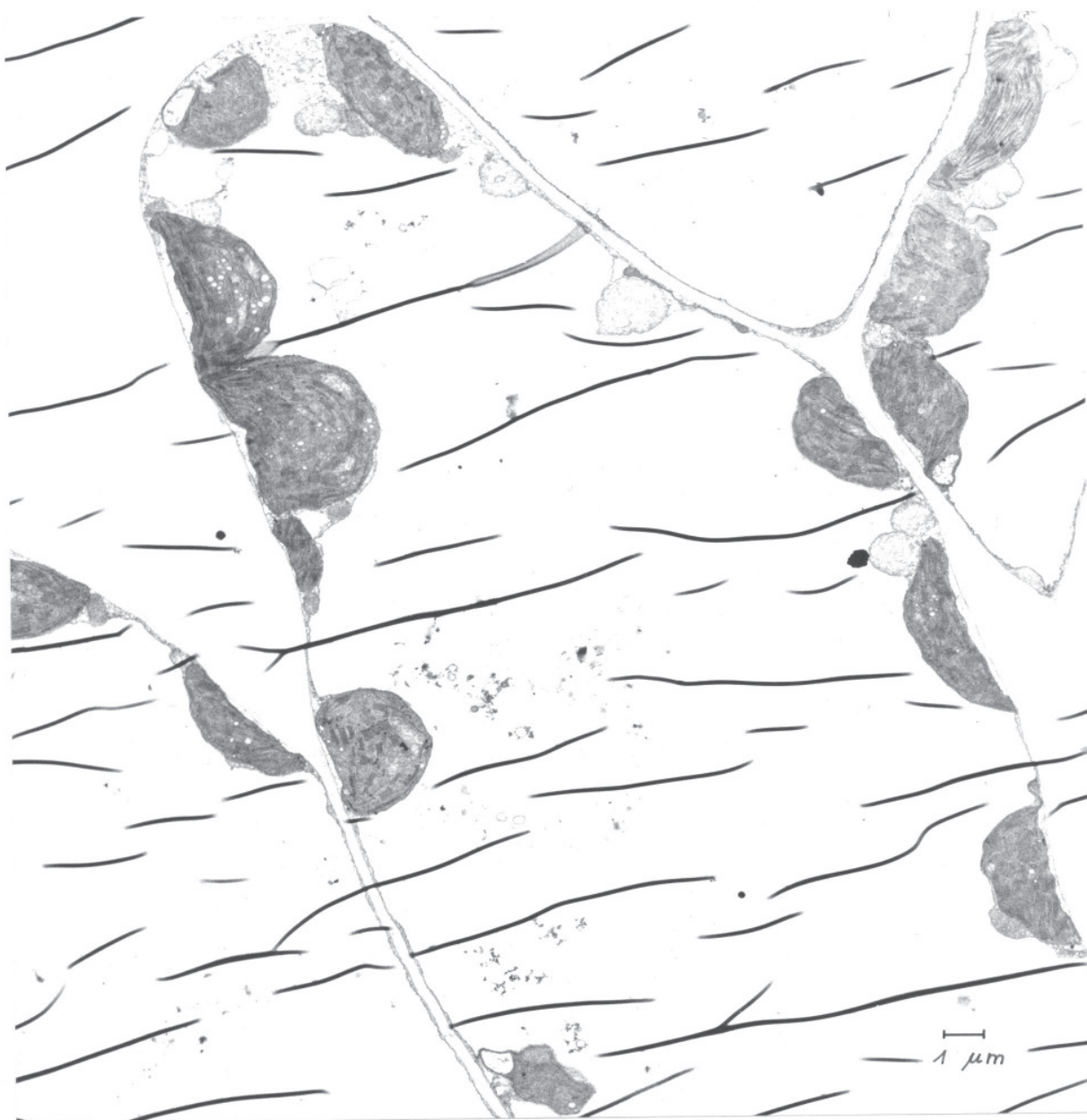


Abb. 16 b

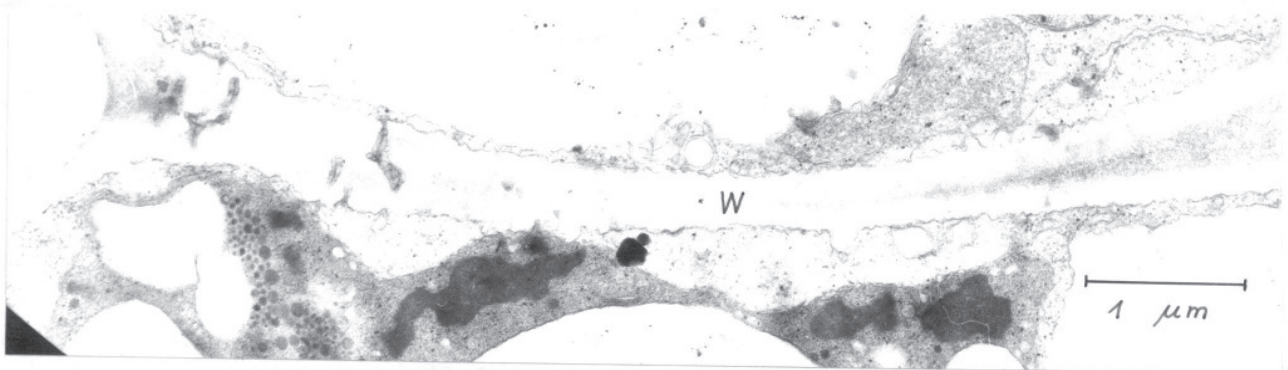
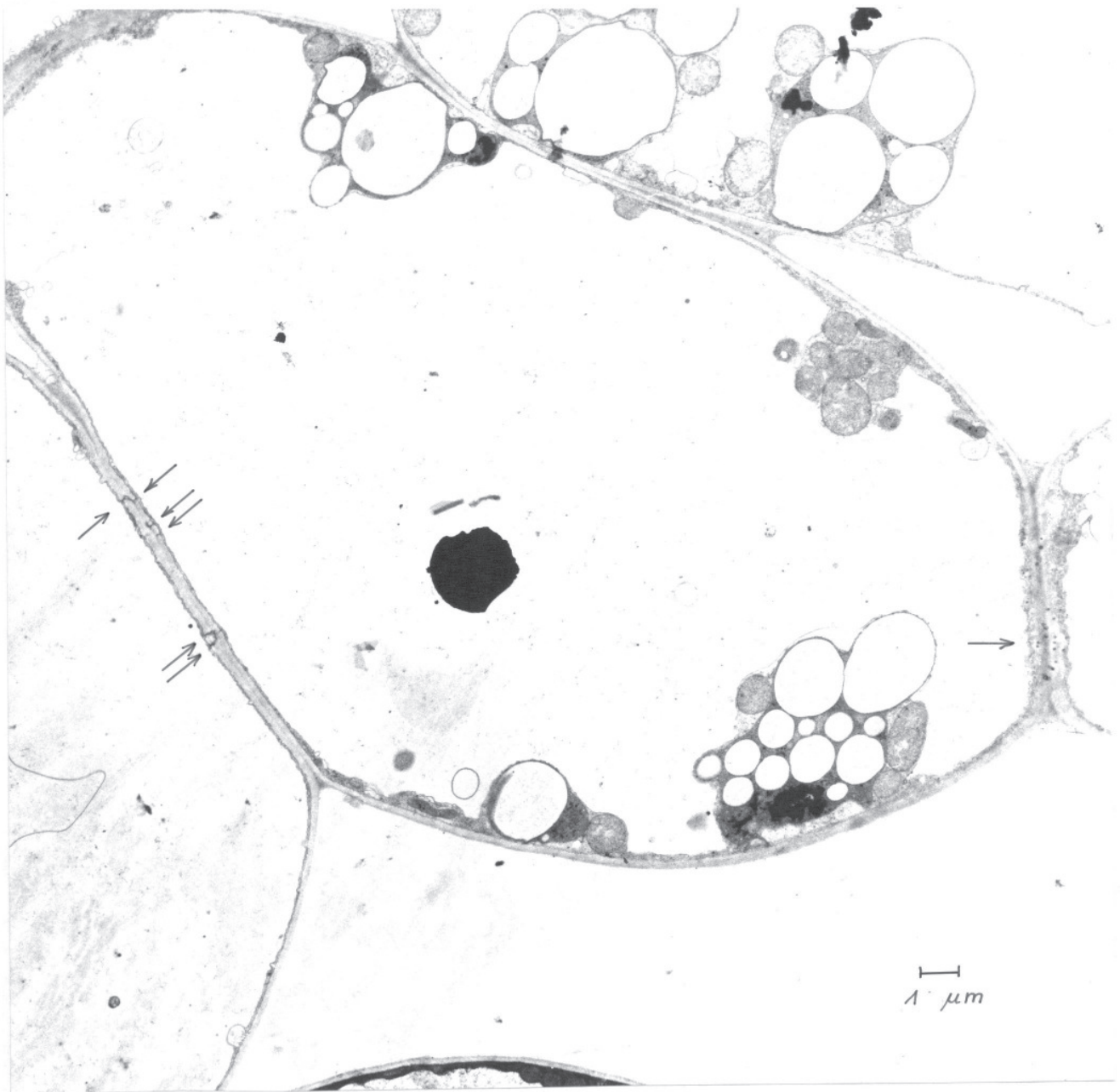


Abb. 16 (Seite 40, 41, 42): Elektronenmikroskopische Bilder von Ultradünnschnitten durch a) Avena-Koleoptilen, b) grüne, c) weiße Blattbezirke von Oenothera hookeri . albicans VI/II γ . Glutaraldehyd/OsO₄-Fixierung, Kontrastierung mit methanolischem Uranylacetat und basischem Bleicitrat. Der obere Teil jeder Abbildung zeigt die Übersichtsaufnahmen zum Vermessen der Zellwandlänge und Auszählen der Plasmodesmen (Pfeile), der untere Teil einige Plasmodesmen zum Bestimmen der Durchmesser (die schwarzen, gewellten Striche in Abb. 16b sind Falten des Trägerfilms, auf dem die Schnitte liegen). W = gemeinsame Zellwand von benachbarten Zellen. Mikroskop: ZEISS EM 9.

4.4 Wirkung von Cycloheximid auf Oszillationen des Membranpotentials, Atmung, O₂-Entwicklung, CO₂-Fixierung und lichtinduzierte pH-Änderungen

In neueren Versuchen von LÄUCHLI et al. wurde der bekannte Proteinsynthese-Hemmstoff Cycloheximid mit Ionentransportvorgängen in Wurzeln in Verbindung gebracht, wobei u.a. ein Einfluß auf den symplasmatischen Transport angenommen wurde. Es lag deshalb nahe, die Weiterleitung der lichtinduzierten Oszillationen (Kapitel 4.2.2), die sehr wahrscheinlich auf einer symplasmatischen Verbindung beruht, in Anwesenheit von CH zu testen. Zunächst aber sollen zur näheren Charakterisierung des Hemmstoffs die wichtigsten bis jetzt bekannten Wirkungen von CH erwähnt werden.

Cycloheximid wurde bisher hauptsächlich als Hemmstoff der Proteinsynthese benutzt (z.B. ELLIS u. HARTLEY 1971). Inzwischen wurden jedoch weitere Wirkungen von CH beschrieben, bei denen es sich auch um Sekundäreffekte der Proteinsynthese handeln kann.

Nach ELLIS u. MacDONALD (1970) wird die Atmung von Rote Beete-Scheiben durch $5 \cdot 10^{-6}$ M CH gesteigert und die Aufnahme von anorganischen Ionen gehemmt (bis zu 75 %). Sie nehmen an, daß die Ionenaufnahme durch die verminderte Energiezufuhr infolge einer entkoppelten Wirkung von CH auf die Atmung beeinflusst wird. Die Hemmung der Ionenaufnahme tritt jedoch

nur bei nicht-grünen Geweben auf; so fanden die Autoren keinen Einfluß auf die Atmung von Kohl-Blattscheiben und die Ionenaufnahme von Lemna und Blattscheiben von Kohl und Tabak. Die Effekte wurden direkt nach Zugabe von CH gemessen.

$3 \cdot 10^{-3}$ M CH hemmen zu 22 % die Malat-bedingte Atmung von isolierten pflanzlichen Mitochondrien, vermutlich über das Flavoprotein der Atmungskette (WILSON u. MOORE 1973). WEBSTER (1973) diskutiert ebenfalls einen möglichen Einfluß von CH auf die Energieübertragung im Zusammenhang mit der Mitose von Vicia faba-Wurzelzellen.

NADLER und Mitarbeiter (1972) konnten mit δ -Aminolävulin-säure (δ -ALA), welche bei der Chlorophyllsynthese eine entscheidende Rolle spielt, die lag-Phase in der Chlorophyllbildung bei ergrünenden Gerstenkeimlingen aufheben, ohne daß dadurch die Entwicklung der Photosynthesereaktionen früher einsetzte. Bei gleichzeitiger Anwendung von δ -ALA und CH wurde die Entwicklung der O_2 -produzierenden Photosynthesereaktion gehemmt, während die Chlorophyllsynthese nur schwach beeinträchtigt war.

Bei Kaninchen werden die Influxe von Na^+ , Cl^- und anderen Ionen (außer Mannit) im Dünndarm gehemmt; die Ursache ist vermutlich in der Proteinsynthese, u.U. in der Synthese eines Carriers zu suchen, da diese Fluxe vom Stoffwechsel und dessen Energie unabhängig sind (FRIZZELL et al. 1973). Ebenfalls einen Einfluß von CH auf die Ionenaufnahme fanden van STEVENINCK u. van STEVENINCK (1972): bei frischen Scheiben der Rübe (Beta vulgaris) tritt sofort eine Hemmung der Ionenaufnahme durch $3,6 \cdot 10^{-6}$ M CH ein, bei gealterten Scheiben erst nach einigen Stunden. Bei frisch angeschnittenem Gewebe ist die Ionenaufnahmerate noch gering (Wundeffekt); sie erhöht sich während der Alterung des Gewebes, bis die Mechanismen der Ionenaufnahme wieder vollständig intakt sind.

Die Autoren nehmen deshalb an, daß CH die Ausbildung der Ionenaufnahmemechanismen verhindert und zwar eher über die Proteinsynthese als über eine direkte Energiekoppelung.

In den Versuchen von LÄUCHLI et al. beeinflusst $3,6 \cdot 10^{-5} \text{M}$ CH weder die Atmung noch die K^+ -Aufnahme und -Akkumulation in Gerstenwurzeln. Auch der ATP-Gehalt bleibt unverändert (LÜTTGE, pers. Mitteilung). Dagegen wird die Proteinsynthese um 60 %, der Transport von Kalium innerhalb von 2,5 Stunden um 90 % und die Guttation von Gerstenkeimlingen innerhalb einer Stunde sogar vollständig gehemmt. Es wird angenommen, daß CH über die Proteinsynthese auf den symplasmatischen oder den vesikulären Transport wirken kann, die beide zu einem gewissen Grade an einen Membran-turn-over gebunden sind (beim symplastmatischen Transport z.B. innerhalb des endoplasmatischen Retikulums).

Die Annahme, daß CH die Weiterleitung der Membranpotentialeffekte beeinflusst, schien sich zu bestätigen, da in einem Vorversuch mit panaschierten Oenothera-Blättern die Oszillationen tatsächlich ausblieben. Kontrollen mit rein grünen Blattbezirken der Mutante $\text{II}\alpha$ zeigten jedoch, daß bereits die Entstehung der Oszillationen gehemmt wird (Abb. 17; es wurde nicht näher untersucht, warum die Kinetik der Oszillationen auch in Abwesenheit von CH eine andere ist als die in Kapitel 4.1.1 beschriebene). Von den sonst langen Oszillationen bei Verdunkelung bleibt nur die rasche Hyperpolarisation übrig; bei dem Lichteffekt nimmt die Amplitude der Depolarisation im Laufe von 90 min nach Zugabe von $10 \mu\text{g}$ CH/ml um 80 % ab (Abb. 25).

Um sicherzugehen, daß diese starke Beeinflussung nicht durch eine Schädigung anderer physiologischer Systeme der Zelle hervorgerufen wird, die in einem Zusammenhang mit den Membranpotentialänderungen stehen (s. Kapitel 4.5 und 5.5), wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen der Einfluß von CH auf die Atmung, O_2 -Entwicklung, CO_2 -Fixierung und die lichtinduzierten pH-Änderungen untersucht (Tabelle 4). Bei keinem dieser Prozesse konnte jedoch eine derartige Hemmung nachgewiesen werden. Auf Grund dieser Werte in Tabelle 4 kann man von der vollen Funktionsfähigkeit der wichtigsten Reaktionen des Stoffwechsel- und Energiehaushaltes der Zelle ausgehen.

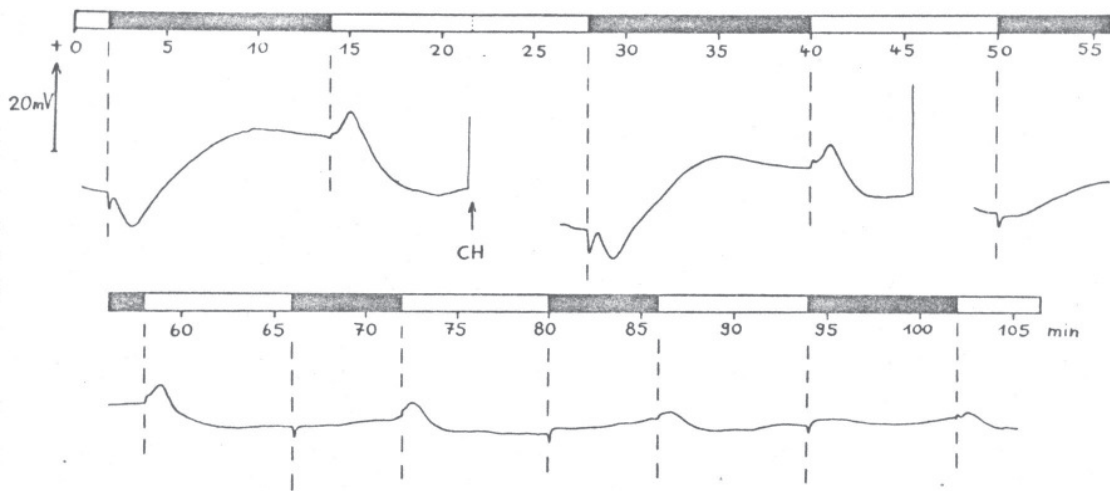


Abb. 17: Lichtinduzierte Oszillationen des Membranpotentials von 3 Palisadenparenchymzellen aus rein grünen Blättern von *Oenothera hookeri* . *albicans* IV/II α , zum Zeitpunkt 22 min wurde das APW gegen eine Lösung von 10 μ g Cycloheximid/ml APW ausgetauscht.

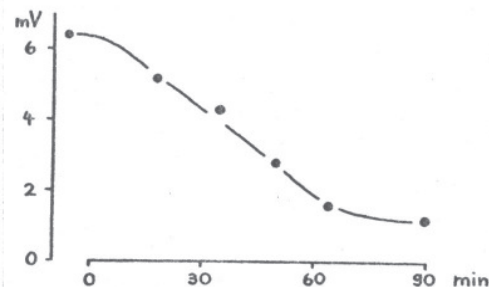


Abb. 18: Amplitude des Licht-an-peaks unter dem Einfluß von Cycloheximid (10 μ g/ml). Die Werte stammen aus dem Versuch in Abb. 17. Zum Zeitpunkt 0 min wurde der Hemmstoff zugegeben.

Tabelle 4: Wirkung von Cycloheximid auf Atmung, O_2 -Produktion, CO_2 -Fixierung (Dunkelfixierung 2,2 bis 6,3 $\mu\text{mol/h}\cdot\text{g}$ Fr.Gew.) und die vorübergehenden pH-Änderungen im Medium von grünen Blattstreifen der Oenothera- α -Mutante bei 25°C . Vor dem Versuch wurden die Blattstreifen auf den durchlüfteten Versuchslösungen 1 Stunde inkubiert. Angegeben sind der Standardfehler und der P-Wert des t-Testes ($n \neq$ Zahl der Freiheitsgrade, sondern Anzahl der Parallelversuche).

	ohne CH	10 μg CH/ml	n	P
O_2 -Verbrauch (Atmung) ($\mu\text{mol } O_2/\text{h}\cdot\text{g}$ Tr.gew.)	125 ± 18	101 ± 13	5	$>0,9$
Netto- O_2 -Entwicklung ($\mu\text{mol } O_2/\text{h}\cdot\text{g}$ Tr.gew.)	304 ± 51	239 ± 29	5	$>0,9$
CO_2 -Fixierung ($\mu\text{mol } CO_2/\text{h}\cdot\text{g}$ Fr.gew.)	$125,6 \pm 2,7$	$120,8 \pm 11,8$	4	$>0,6$
Lichtinduzierte H^+ -Aufnahme ($\mu\text{mol } H^+/\text{h}\cdot\text{g}$ Tr.gew.)	111 ± 9	100 ± 6	5	$>0,3$
Dunkelinduzierte H^+ -Abgabe ($\mu\text{mol } H^+/\text{h}\cdot\text{g}$ Tr.gew.)	77 ± 8	78 ± 8	5	$>0,8$

4.5 Diskussion

Die geschilderten Oszillationen des Membranpotentials von Oenothera sind zweifellos lichtbedingte Reaktionen der Zelle, da die Mikroelektroden selbst nicht lichtempfindlich sind und die geringe Temperaturerhöhung in der Küvette (ca. $0,5^\circ\text{C}$) das Potential der Elektroden um höchstens 1 mV verändern kann (Kapitel 2.4 und 3; BERG u. BONKE, pers. Mitteilung).

Die Abhängigkeit der Übergangsschwingungen von der Lichtintensität konnte in dem Sinne bestätigt werden (LÜTTGE u. PALLAGHY 1969), daß ein Lichteffect nicht nur vom Dunkel nach Licht auftritt, sondern die Erhöhung der Intensität

zu einem erneuten (kleineren) Lichteffect führt. Die starken Effekte, die das Einlegen von Filter I und II hervorruft, könnten auch unter dem Aspekt der Intensitätsverminderung betrachtet werden, jedoch kann auf Grund der gezeigten Versuche ein zusätzlicher Einfluß der Wellenlänge des Lichtes nicht ausgeschlossen werden. Eine Analyse über die Abhängigkeit des Licht- und Dunkeleffektes von der Lichtintensität wurde von GRADMANN (1970) an Acetabularia crenulata gemacht. Danach werden die Amplituden und die Anstiegswinkel der peaks mit Erhöhung der Lichtintensität größer. Ebenso erreicht der Lichteffect bei höheren Intensitäten seinen Maximalwert in kürzerer Zeit; beim Dunkeleffect bleibt dieser Zeitpunkt unverändert. Unter der Voraussetzung, daß Photosystem I und II einwandfrei arbeiten (MacROBBIE 1965), könnten deshalb die Verringerung der Licht- und Dunkeleffekte in Anwesenheit von Filter I auf die geringere Lichtintensität gegenüber Weißlicht zurückgeführt werden.

Wegen des Ausbleibens der Effekte in Anwesenheit von Filter II und der DCMU-Empfindlichkeit (ANDRIANOV et al. 1969, VREDENBERG 1969, THROM 1971a) vermuteten LÜTTGE u. PALLAGHY (1969) die Ursache der Oszillationen in den Reaktionen des Photosystems II. Aus dem hier gezeigten unerwarteten Auftreten der Effekte bei höheren Intensitäten trotz Filter II kann jedoch noch nicht auf eine Beteiligung beider Photosysteme geschlossen werden; es liegt vielmehr näher zu fragen, ob von dem Filter die Wellenlängen < 705 nm genügend scharf ausgefiltert werden, d.h. ob das PS I unter diesen Versuchsbedingungen nicht doch noch angeregt wird, und wo das Oenothera-Gewebe das Licht der eingestrahnten Wellenlängen absorbiert. Die Beantwortung der zweiten Frage ist schwierig, da für Oenothera-Blätter kein Absorptionsspektrum erstellt wurde. Über die Schärfe der Filterung liegen dagegen Angaben vor: Nach MacROBBIE (1965) liegt für Filter II eine Transmission von 20 % bei 710 nm, nach LÜTTGE u. PALLAGHY (1969) bei 709 nm, nach eigenen Kontrollen bei 717 nm (Filter II + Neutralfilter, gegen Luft gemessen im Zeiss-Spektralphotometer PM QII); das bedeutet, daß Filter II

tatsächlich noch eine geringe Anregungsenergie bei Wellenlängen < 705 nm zur Verfügung stellen kann (in dem selbst aufgestellten Spektrum beträgt die Transmission bei 705 nm noch etwa 5 %), die dann bei höheren Lichtintensitäten relevant wird.

Andererseits treten auch bei Elodea trotz Anwesenheit von DCMU mit Starklicht große lichtinduzierte Membranpotentialeffekte auf, die bei schwachem Licht erheblich kleiner sind (JESCHKE 1970). Das Aktionsspektrum der langsamen lichtinduzierten Ruhepotentialänderungen von Acetabularia crenulata zeigt auch bei Wellenlängen bis zu 730 nm noch deutliche Lichteffekte (SCHILDE 1966); ähnliches gilt für die schnellen lichtinduzierten Änderungen des Chloroplastenpotentials von Peperomia metallica (BULYCHEV et al. 1972a). Die beiden Aktionsspektren haben wie die Absorptionsspektren der Alge bzw. des intakten Blattes ihre Hauptmaxima jedoch zwischen 670 und 690 nm. Damit hat das photosynthetisch aktive Licht die größte Wirkung. Bei Acetabularia tritt zusätzlich zwischen 570 und 630 nm eine starke Reaktion auf, die vielleicht mit der Schulter im Aktionsspektrum von Peperomia identisch ist.

Etwas klarere Aussagen lassen sich jetzt mit den Photosynthese-Mangelmutanten von Oenothera machen. Hier wurde ohne experimentell bedingte Eingriffe, die häufig zu Nebeneffekten oder schwer zu interpretierenden Ergebnissen führen, gezeigt, daß die Oszillationen des Membranpotentials nicht nur an den Elektronentransport des PS II gebunden sein können; denn auch bei der α -Mutante, deren PS I blockiert ist, während das PS II noch deutliche Aktivitäten zeigt (FORK u. HEBER 1968), ließen sich bisher keine Licht- oder Dunkeleffekte auf das Membranpotential nachweisen.

In die gleiche Richtung weisen Versuche mit Griffithsia (THROM 1971a), Nitella (VREDENBERG 1971b) und Peperomia (BULYCHEV et al. 1972b), bei denen das PS II durch DCMU ausgeschaltet und die Elektronen von künstlichen Elektronenüberträgern geliefert wurden; in diesem System treten ebenfalls lichtinduzierte Reaktionen des Membranpotentials

auf, wenn auch in umgekehrter Richtung. Daneben konnte THROM (1971b) auf Grund von Aktionsspektren in Anwesenheit von Hemmstoffen zeigen, daß die lichtabhängige Änderung des Membranpotentials von Griffithsia von PS I und PS II abhängig ist, wobei das PS II allerdings den überwiegenden Teil an der Ursache der Effekte ausmacht. Die Versuche von THROM (1971 a und b) ergaben ferner, daß Plastochinon vermutlich die Koppelungsstelle des photosynthetischen Elektronentransportes mit den lichtabhängigen Änderungen des Membranpotentials ist. Plastochinon, das als Elektronenüberträger zwischen beiden Photosystemen fungiert und somit an die Aktivität entweder eines oder beider Photosysteme gekoppelt ist, könnte seinerseits eine Redoxkomponente steuern, die dann den Lichteffect des Membranpotentials verursacht (THROM 1971b).

Die mit Hemmstoffen, künstlichen Elektronenüberträgern und Aktionsspektren gewonnenen Ergebnisse, die eine Beteiligung beider Photosysteme an den Membranpotentialeffekten erkennen ließen, werden jetzt durch die Versuche mit den Oenothera-Mutanten belegt. An diesem System konnte einzig durch Ein- oder Ausschalten des weißen Lichtes, d.h. ohne zusätzliche Belastung des Materials mit Fremdstoffen, gezeigt werden, daß die lichtinduzierten Membranpotentialänderungen bei Oenothera weder vom PS I noch vom PS II alleine abhängig sind, sondern an das Zusammenwirken beider Photosysteme gebunden sein müssen.

Cycloheximid, das bisher hauptsächlich als Hemmstoff der Proteinsynthese bekannt war, hemmt die lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials. Diese Hemmung ist erstaunlich, da es schwer fällt, einen Zusammenhang zwischen den relativ schnell ablaufenden Membraneffekten und der Synthese von Proteinen herzustellen. Ebenso unerwartet ist der Befund, daß die photosyntheseabhängigen Prozesse, die mit den lichtinduzierten Oszillationen in Verbindung gebracht werden (vgl. Kapitel 5.5), keine derartige Hemmung erfahren. Auch wurde kein Einfluß von CH auf die Atmung von Oenothera-

Blättern festgestellt (die Konzentration war zwei Zehnerpotenzen niedriger als in den Versuchen von WILSON u. MOORE 1973). Zur Deutung dieser Ergebnisse ist eine genaue Kenntnis des Angriffortes und der damit verbundenen Wirkungen von CH nötig.

In Kapitel 4.4 wurde bereits auf andere Effekte als die der Proteinsynthese-Hemmung von CH hingewiesen. Die Wirkung von CH an Oenothera-Blättern scheint sich in den vorliegenden Versuchen tatsächlich nur auf die Membranpotentialänderungen zu beschränken. Da die photosyntheseabhängigen Reaktionen, die bisher in einem Zusammenhang mit den lichtabhängigen Membranpotentialeffekten gesehen wurden (speziell die lichtinduzierten pH-Änderungen, s. Kapitel 5.5), von CH anscheinend nicht beeinflusst werden, kann der Angriffspunkt von CH also nicht in einem gemeinsamen Entstehungsort dieser Effekte liegen. In der zitierten Literatur (Kapitel 4.4) werden mehrfach Membraneffekte diskutiert, speziell im Cytoplasma. Man könnte annehmen, daß die Entstehung der Oszillationen und der lichtinduzierten pH-Änderungen in den Chloroplasten nicht beeinflusst wird, durch CH jedoch eine Änderung der Leitfähigkeit des Cytoplasmas für die Membranpotentialänderungen eintritt, so daß die in der Vakuole gemessenen Potentiale nur noch geringe lichtinduzierte Schwingungen widerspiegeln können. Das setzt allerdings voraus, daß die lichtabhängigen Protonenfluxe nicht oder nur beschränkt die Ursache der Membranpotentialeffekte z.B. am Tonoplasten sind, d.h. es bestünde keine direkte Wechselwirkung zwischen den apparenten Protonenfluxen und den Membranpotentialänderungen. Falls die Lichteffekte an den Membranen von einer im Cytoplasma befindlichen Redoxkomponente gesteuert werden (THROM 1971b), so böte sich auch hier ein Angriffspunkt für CH.

Solange jedoch keine weiteren Angaben über die Wirkung von Cycloheximid vorliegen, bleiben diese Überlegungen rein spekulativ.

An dieser Stelle sollen als Beispiel der zahlreichen Arbeiten über extrazelluläre Potentialmessungen (eine historische Übersicht findet sich bei SCHILDE 1968a) die Versuche von WALLER (1925) erwähnt werden, die die gleichen Themen wie die vorliegende Arbeit behandeln.

WALLER befestigte symmetrisch an der Blattunterseite z.B. von Pelargonium zonale zwei nichtpolarisierbare Elektroden, deckte die eine Blatthälfte ab und maß so Spannungsunterschiede, die zwischen der Elektrode im Schatten und der an der belichteten Blatthälfte bei Beleuchtungswechsel auftraten. Diese Spannungsänderungen laufen innerhalb weniger Minuten in Form eines kleinen peaks mit Amplituden bis zu 9 mV ab. Die Richtung der Spannungsänderung wechselt bei verschiedenen Pflanzen. Statt eines grünen Blattes, von dem ein Teil verdunkelt wurde, konnte WALLER auch ein panaschiertes Blatt verwenden, dessen bleicher Teil die Rolle der beschatteten Hälfte beim Kontrollblatt übernahm. Rein weiße Blätter und chloroplastenfreie Blütenblätter zeigten keine lichtinduzierten Reaktionen; Ausnahmen davon waren ein bestimmtes Stadium des Blütenblattes von Hydrangea hortensia, das zunächst grün, dann bleich und zum Schluß seiner Entwicklung wieder grün ist, und die inneren Blätter von bleichem Sellerie. Die Effekte konnten durch Erhöhung der CO₂-Konzentration in der Luft erheblich gesteigert werden.

WALLER schloß aus diesen Versuchen, daß die photoelektrischen Effekte von der "Stoffwechselaktivität des Chlorophylls" abhängen. Eine Verbindung dieser extrazellulären Ableitungen mit den lichtinduzierten Membranpotentialeffekten machten VOLKOV u. MISYUK (1971); sie führten Änderungen des Potentials, welche durch Beleuchtungswechsel am Blatt abgeleitet werden können, auf Änderungen des Plasmalemmapotentials der Palisadenparenchymzellen in dem beleuchteten Teil von Bohnenblättern zurück.

Weiß, mutierte Zellen, die sich in Kontakt mit normalen grünen Zellen befinden, können für die erwähnten Untersuchungen über die Photosyntheseabhängigkeit nicht benutzt werden,

da die in den grünen Zellen entstehenden Oszillationen in die weißen Zellen übertragen werden. Diese Übertragung ist offensichtlich an den symplasmatischen Kontakt gebunden, da ein grünes Blattstück mit intakten Chloroplasten, das neben dem rein weißen Gewebe getrennt in der Versuchslösung schwimmt, keine Oszillationen in den weißen Zellen induzieren kann. Bei der Weiterleitung der Oszillationen handelt es sich sicherlich um das gleiche Phänomen wie es LÜTTGE u. PALLAGHY (1969) für Chenopodium beschrieben haben: das Membranpotential der chloroplastenfreien Blasenellen auf der Epidermis zeigt keine Reaktionen auf Licht, wenn die Epidermis von dem grünen Mesophyll isoliert wurde; bei der intakten Verbindung zwischen Epidermis und Mesophyll, die zahlreiche Plasmodesmen enthält, treten die Oszillationen jedoch wieder auf.

Die Oszillationen werden wahrscheinlich nicht über Ionen mit Hilfe des symplasmatischen Transportes innerhalb der Zellen übertragen, da dieser Transport zu langsam ist. Bei dem Versuch in Abb.14 ist die nächste grüne Zelle mindestens 0,89 mm entfernt; bei einer Geschwindigkeit des symplasmatischen Ionen- und Metabolittransportes von ca. 5 cm/h (TYREE 1970, BOOIJ 1971, OSMOND 1971) müßte das Signal mit einer Verzögerung von etwa 50 sec in den weißen Zellen eintreffen. Das ist jedoch nicht der Fall.

Eine einfachere Erklärung ist in der elektrischen Leitfähigkeit von Salzlösungen zu finden, in denen der Strom ohne größere Verzögerung fließen kann. SIBAOKA (1960) vermutet eine elektronische Übertragung des Aktionspotentials an Mimosa-Zellen; ebenso nehmen SKIERCZYNSKA et al. (1973) eine elektrisch sehr gut leitende Schicht direkt am Plasmalemma von Chara an.

Selbst wenn im Cytoplasma die elektrischen Signale wie in Elektrolytlösungen weitergeleitet werden, können an den Verbindungsstellen der einzelnen Zellen Schwierigkeiten auftreten, da das elektrische Verhalten zeigt, daß die Plasmodesmen keinesfalls einfache offene Kanäle zwischen zwei Zellen sind (SPANSWICK 1972). Die Frage über die Struk-

tur (ROBARDS 1971) und das elektrische Leitvermögen der Plasmodiesmen ist bisher nicht restlos geklärt. GOLDSMITH et al. (1972) fanden keine elektrische Verbindung zwischen benachbarten Zellen der Avena-Koleoptile; sie führten das auf eine 225 bzw. 37 mal geringere Plasmodiesmenhäufigkeit beim Hafer gegenüber jungen und alten Nachbarzellen von Nitella translucens (SPANSWICK u. COSTERTON 1967) zurück. Bei Oenothera liegt die Plasmodiesmenhäufigkeit in der gleichen Größenordnung wie bei der Hafer-Koleoptile; es kann also in diesem Falle nicht an der Zahl der Plasmodiesmen liegen, daß die Oszillationen selbst über weite Strecken fortgeleitet werden. Vielleicht spielt hierbei auch die Natur des elektrischen Signals eine Rolle: bei Nitella und Avena wurden von außen elektrische Pulse mit Mikroelektroden in die Zellengewebe gegeben und die Antwort der Nachbarzellen registriert; bei Oenothera handelt es sich dagegen um ein endogen entstehendes Signal. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, daß die elektrische Leitfähigkeit der Zellen durch experimentelle Eingriffe beeinträchtigt wird. VREDENBERG (1969) beschreibt für Nitella translucens ebenfalls eine, wenn auch geringe, Antwort der unbeleuchteten Nachbarzelle bei Beleuchtungswechsel.

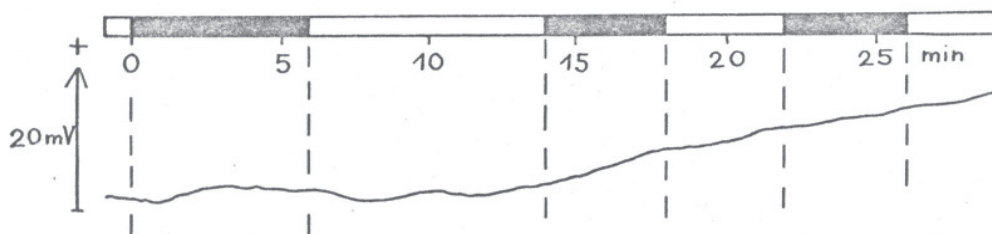
Im Gegensatz zu GOLDSMITH et al. (1972) hat SPANSWICK (1972) eine elektrische Koppelung zwischen benachbarten Zellen von Hafer-Koleoptilen, Elodea-Blättern und Maiswurzeln nachgewiesen, obwohl auch er für Nitella translucens einen Stromfluß von Zelle zu Zelle für unwahrscheinlich hält, da er in den Plasmodiesmen nur sehr selten endoplasmatisches Retikulum (ER) fand (SPANSWICK 1970). Ein durchgehendes ER würde die elektrische Leitfähigkeit der Plasmodiesmen begünstigen, da der Strom an den Porenöffnungen keine zusätzlichen Membranen zu durchdringen hätte (vgl. Vorbemerkung zu Kapitel 4). Falls die elektrische Leitfähigkeit der Plasmodiesmen von der Anwesenheit eines durchgehenden endoplasmatischen Retikulums abhängt, so könnte damit auf Grund des Photos in Abb. 16b die gute Leitfähigkeit der Oenothera-Mesophyllzellen für die lichtinduzierten Oszillationen erklärt werden.

5 Versuche mit ergrünender etiolierter Gerste

Die schon bei Oenothera hervorgehobenen Vorteile des Untersuchungsmaterials gelten auch für die Gerste: das Verhalten der Membranpotentialeffekte während der Ergrünung läßt sich ohne zusätzliche äußere Eingriffe in den physiologischen Zustand der Zelle studieren, da das Ergrünen ein von innen gesteuerter Vorgang ist. Die im Dunkeln aufgezogene Gerste ergrünt bei Belichtung und wird dadurch photosynthetisch aktiv. Da die Oszillationen des Membranpotentials photosyntheseabhängig sind, bietet sich die Möglichkeit an, die Entwicklung der Oszillationen parallel mit anderen photosyntheseabhängigen Prozessen zu untersuchen. Die im Folgenden geschilderten Versuche wurden unter denselben Ergrünungsbedingungen gemacht wie die Versuche von LÜTTGE et al. (1973); dort wurden der Chlorophyllgehalt, die Struktur der Chloroplasten, die O_2 -Entwicklung, die CO_2 -Fixierung, die Atmung und die lichtinduzierten pH-Änderungen während der Ergrünung im Weißlicht bestimmt.

5.1 Ergrünung im Weißlicht

Das Membranpotential von Mesophyllzellen des Gerstenkeimlings, der 6 Tage in völliger Dunkelheit herangezogen wurde, zeigt keine Reaktion auf Licht (Abb. 19).



: Abb. 19: Keine Wirkung des Lichtes auf das Membranpotential einer Mesophyllzelle von etiolierten Gerstenkeimlingen, die 6 Tage in völliger Dunkelheit gezogen wurden.

Um zufällige Störungen im zeitlichen Verlauf des Membranpotentials von den Lichteffekten trennen zu können, wurde bei allen Versuchen das Lichtprogramm stets zur vollen geraden Minute geändert, so daß z.B. das Licht nur 8, 10, 12 ... Minuten brannte. So können die leichten Schwankungen und der depolarisierende Trend in Abb. 19 durchaus als beleuchtungsunabhängige Vorgänge angesehen werden, zumal in mehreren anderen Versuchen ebenfalls keine Reaktion auf Licht beobachtet wurde.

Bereits eine Stunde nach Umsetzen des Keimlings in die belichtete Klimakammer erscheinen lichtinduzierte Änderungen des Membranpotentials, deren Größe und Kinetik sich im Laufe der Ergrünung ändert (Abb. 20). Im Gegensatz zu Oenothera (Abb. 8) wird bei Gerste das Membranpotential durch Einschalten des Lichtes depolarisiert (Abb. 20); zu Beginn der Ergrünung treten kleine Verzögerungen in der Depolarisierung auf (Schultern im Kurvenverlauf), die bei grünen Pflanzen nicht mehr zu sehen sind. Nach dem Durchlaufen einer maximalen Depolarisierung wird das Potential im Licht wieder hyperpolarisiert, meistens über den Wert zu Beginn der Belichtung hinaus, um dann langsam auf ein konstantes Niveau einzuschwingen.

Das Ausschalten des Lichtes führt zu einer vorübergehenden Schwingung des Membranpotentials (Abb. 20), die ebenfalls gegensinnig zu den Oenothera-Schwingungen verläuft: zu Beginn der Dunkelheit wird die Membran bis zu einem maximalen Wert hyperpolarisiert, dann wieder depolarisiert; die Depolarisierung geht zu Beginn der Ergrünung in eine erneute Hyperpolarisierung über, während sich bei den grünen Pflanzen bereits nach dieser Depolarisierung das Ruhepotential einstellt.

Die Belichtung und die Dunkelheit dauerte jeweils etwa 10 min; auf diese Weise sollte vermieden werden, daß durch große Unterschiede in der Dauer der Vorbehandlung die Effekte beeinflußt werden. So sind z.B. bei Nitella translucens nach 20 min Dunkelheit die Effekte (Licht-Dunkel-Wechsel in ca. 2 min Abstand) 4 mal kleiner als nach der darauf folgenden Belichtung von 20 min (VREDENBERG 1972). Trotzdem wurde im

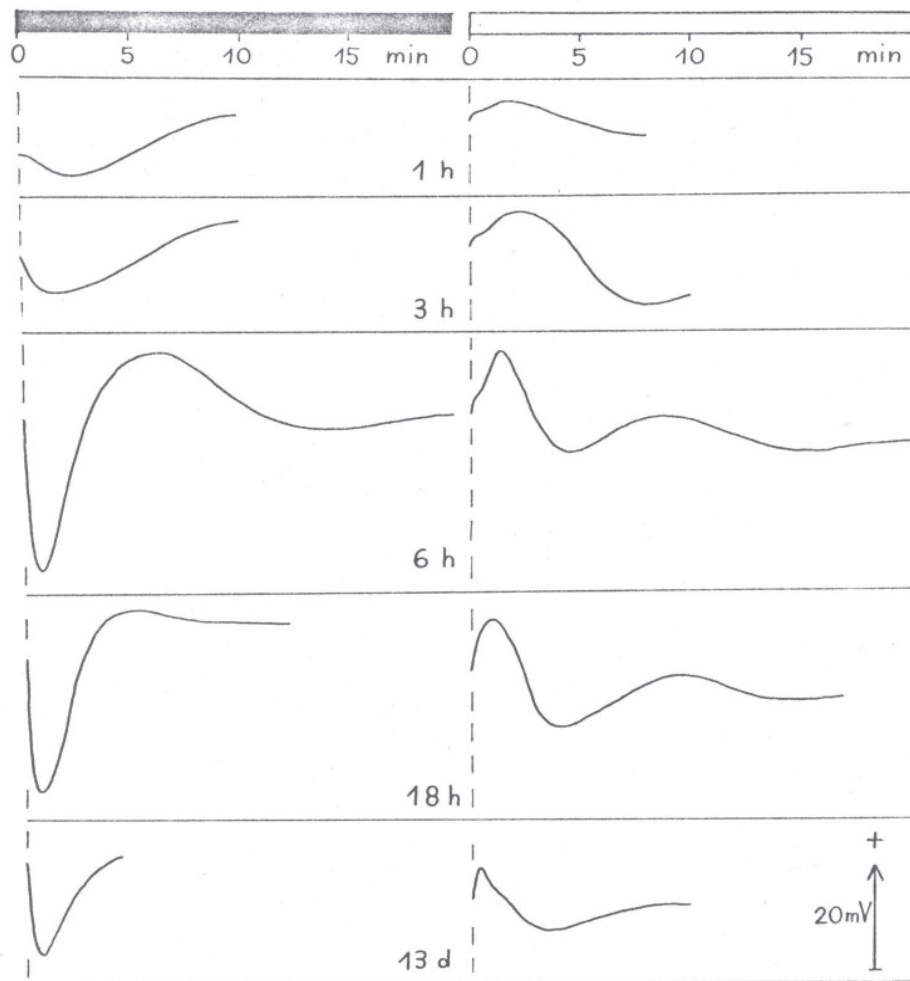


Abb. 20: Oszillationen des Membranpotentials von Gersten-Mesophyllzellen nach Abschalten (links) und Einschalten (rechts) des Lichtes in Abhängigkeit von Ergrünung (1, 3, 6, 18 Stunden im Licht); als grüne Kontrollpflanze diente Gerste, die 13 Tage auf KNOP'scher Nährlösung im Gewächshaus gezogen wurde.

Verlauf eines Versuches (ca. 1 Stunde) manchmal eine Zunahme der Größe und Geschwindigkeit der Oszillationen beobachtet, in der Auswertung jedoch nicht berücksichtigt. Man kann annehmen, daß das Folge der Adaptation des Gewebes an die neue Umgebung ist.

Um die Entwicklung der Oszillationen während der Ergrünung quantitativ zu erfassen, wurden jeweils an dem ersten peak nach Beleuchtungswechsel folgende Größen bestimmt (Abb. 21, vgl. GRADMANN 1970): die Steigung der Tangente des Anstiegs (Winkel α) und des Abfalls (Winkel β), die maximale Höhe (Amplitude a), die Dauer (d) des peaks bei Verdunkelung und die Zeit, die zum Erreichen der halben Amplitude benötigt wurde (Halbwertszeit $t_{1/2}$). Da die Depolarisierung des Licht-an-peaks vor der Schulter eine relativ konstante Steigung hat während der Grünung, wurde nur die Tangente (Winkel α) der Depolarisierung nach der Schulter gemessen, die die Hauptflanke des peaks ausmacht.

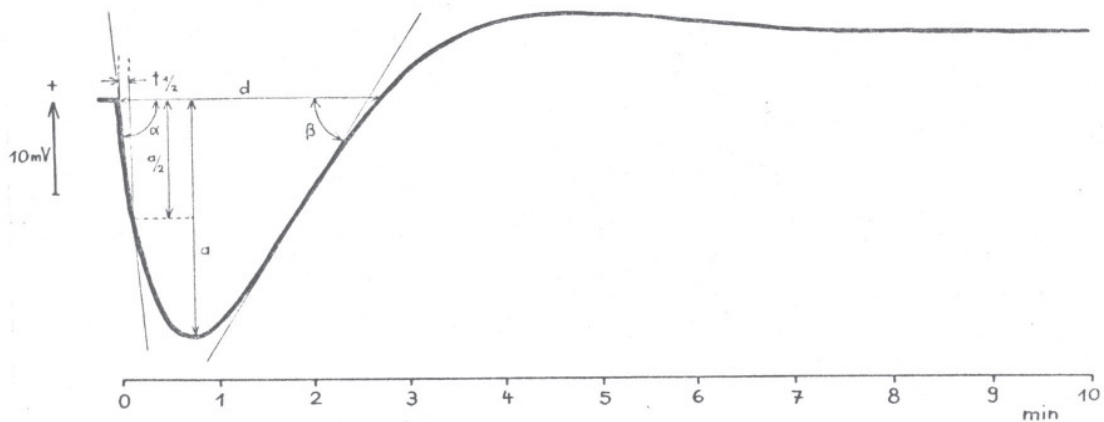


Abb. 21: Vorübergehende Änderung des Membranpotentials einer Mesophyllzelle der Gerste nach Ausschalten des Lichtes (Ergrünungsdauer 6 Stunden). a = Amplitude, d = Dauer, α = Anstiegswinkel, β = Abfallswinkel, $t_{1/2}$ = Halbwertszeit des ersten peaks nach Beleuchtungswechsel.

In Abb. 22 sind diese Parameter der Membranpotentialänderungen gegen die Ergrünungszeit aufgetragen. Die Dauer des Licht-aus-Effektes ändert sich nur wenig mit der Ergrünung.

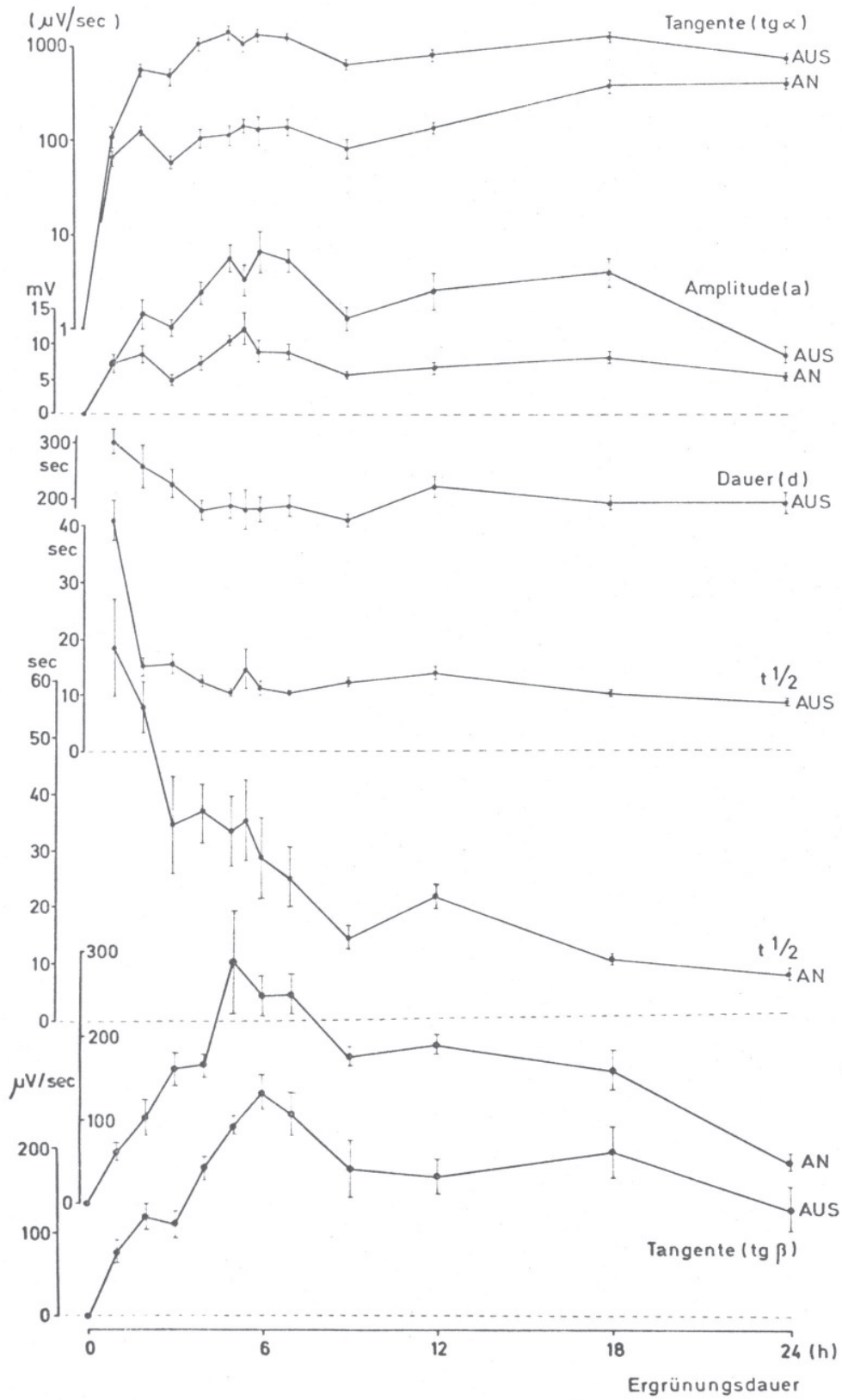


Abb. 22 (Seite 59): Änderung der in Abb. 21 dargestellten Größen im Laufe der Ergrünung von Gerstenkeimlingen. AN steht für den peak (Depolarisation), der nach Einschalten des Lichtes eintrat, AUS für den peak nach Ausschalten des Lichtes. Gesamtergebnis aus 7 parallelen Ergrünungsversuchen, $n = 3$ bis 12. Die Abweichungen vom Mittelwert sind Standardfehler.

Außer der Anstiegstangente und der Halbwertszeit des Lichtan-peaks erreichen alle anderen Größen ihre maximalen Werte innerhalb der ersten 6 Stunden nach Einsetzen der Ergrünung.

Die Entstehung der Oszillationen kann auch durch eine kurze, intensive Beleuchtung ausgelöst werden: nach der Anzucht im Dunkeln wurden die Gerstenkeimlinge mit 10 Blitzen à 1/1000 sec (Metz mecablitz 196 L 25 C) in etwa 20 cm Abstand bestrahlt. 3 Stunden danach hatten die lichtinduzierten Oszillationen etwa die gleiche Größe und Kinetik wie nach einer Stunde Ergrünung im Dauerlicht. 6 und 9 Stunden später waren jedoch nur noch schwache Reaktionen auf Licht festzustellen.

5.2 Ergrünung im Dunkelrotlicht

Im Dunkelrotlicht wird die Ergrünung von etiolierten Pflanzen erheblich verzögert (de GREEF et al. 1971, OELZE-KAROW u. BUTLER 1971); bei Bohnenblättern ist z.B. die Zunahme der photosynthetischen O_2 -Entwicklung etwa 12 mal langsamer als im Weißlicht (OELZE-KAROW u. BUTLER 1971). Die Entwicklung der lichtinduzierten Oszillationen ist ebenfalls verzögert. In Abb. 23 sind die Reaktionen des Membranpotentials auf Weißlicht und Dunkelheit dargestellt, nachdem die Pflanze 15 Stunden im Dunkelrotlicht ergrünt war; der Dunkeleffekt in der 22. Minute hat denselben Verlauf wie der Dunkeleffekt nach 3 Stunden Ergrünung im Weißlicht (Abb. 20).

Im Laufe eines Versuchs ändern sich die Größen des Licht-an- und Licht-aus-peaks (Abb. 23).

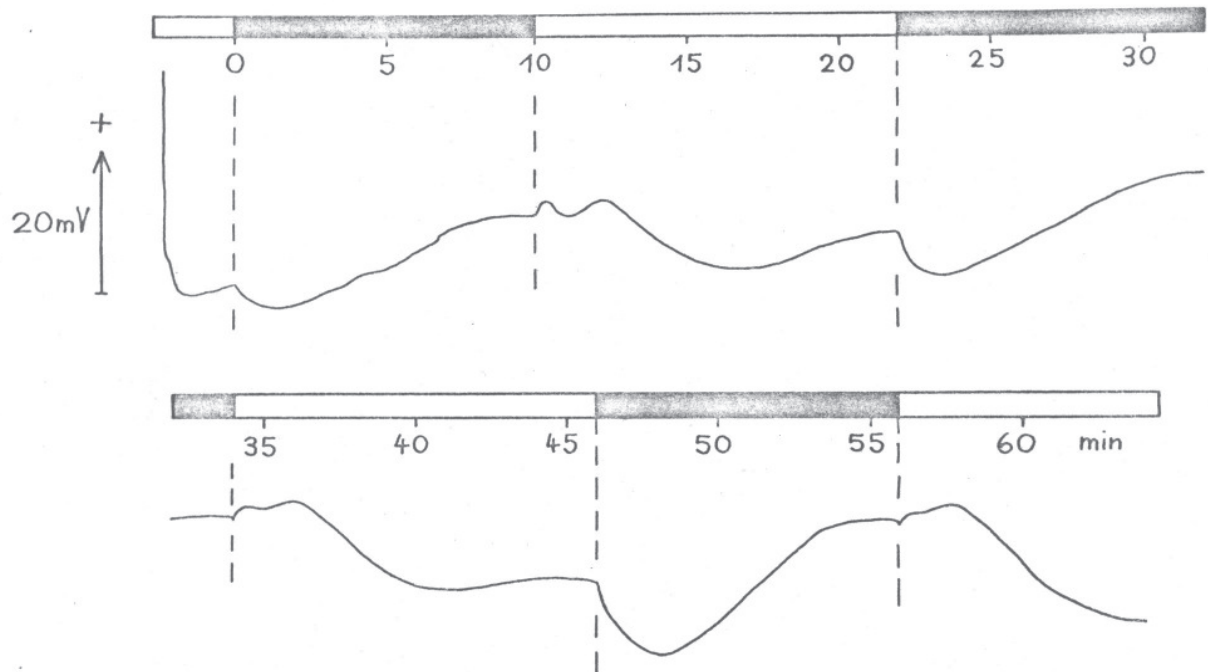


Abb. 23: Wirkung des weißen Lichtes auf das Membranpotential einer Mesophyllzelle von etiolierten Gerstenkeimlingen, die 15 Stunden im Dunkelrotlicht ergrünt.

Das Licht ruft während der Präparation und der Lichtphasen eine zusätzliche rasche Ergrünung hervor, da auch der Chlorophyllgehalt noch nach Abschneiden der Blätter zunimmt (LÜTTGE, unveröffentlicht). Deshalb wurde für die Ergrünung im Dunkelrotlicht keine quantitative Analyse der Licht- und Dunkeleffekte gemacht. Interessant ist jedoch der häufiger beobachtete Verlauf der Licht-an-Reaktion: zum Zeitpunkt 10 min (Abb. 23) erzeugt das Licht innerhalb von etwa 30 sec einen kleinen Depolarisationspeak, dem eine zweite etwas länger dauernde Depolarisation folgt. Im Laufe des Versuchs verschwindet die Hyperpolarisation zwischen den beiden peaks, so daß beide zu einem einzigen verschmelzen;

es entsteht der vom Weißlicht bekannte Licht-an-peak mit einer Schulter. Es sieht so aus, als ob die Depolarisationen mehr oder weniger unverändert bleiben und nur die hyperpolarisierende Komponente verloren geht. Im Weißlicht (Abb. 20) wächst dann zusätzlich die zweite Depolarisation an und setzt früher ein, so daß die hier noch deutlich sichtbare erste Depolarisation überlagert wird.

5.3 Ionengehalt der Blätter

Für die Korrektur des Ruhepotentials einer Gerstenzelle (Kapitel 3) ist es wichtig, die Konzentrationen der wichtigsten Ionen im Innern der Zelle zu kennen. Deshalb wurden die Konzentrationen von Kalium, Natrium und Chlorid im Gesamt-extrakt von Gerstenkeimblättern bestimmt. Vorversuche hatten ergeben, daß die Kaliumkonzentration im Laufe der Ergrünung ansteigt; um zu klären, ob dieser Anstieg durch die Belichtung hervorgerufen wird oder ob er ein Ausdruck der Blattentwicklung ist, wurde auch in den 24 Stunden vor der Belichtung der Kaliumgehalt bestimmt.

Die KNOP'sche Nährlösung enthält kein Natrium; in der Spurenelementlösung nach HOAGLAND befinden sich geringe Mengen Chlorid. Bei der Natriumbestimmung wurde deshalb auch in 21 von 36 Proben kein Natrium gefunden, in den übrigen Natriumkonzentrationen unter $1,5 \mu\text{mol/g}$ Frischgewicht; das läßt sich durchaus als Verunreinigung während der Extraktion erklären. Erwartungsgemäß ist auch der Chloridgehalt nicht sehr hoch (Tabelle 5): er liegt während der Ergrünung zwischen 2,1 und $6,4 \mu\text{mol/g}$ Frischgewicht. Die aus Tabelle 5 ersichtliche Abnahme des Chloridgehaltes in den ersten Stunden der Ergrünung soll wegen der ohnehin geringen Mengen an Cl^- nicht weiter diskutiert werden. Das Trockengewicht der Blätter macht etwa 7,5 bis 8,5 % des Frischgewichtes aus. Abb. 24 zeigt die mehr oder weniger gleichmäßige Zunahme der Kaliumkonzentration in den Gerstenblättern während des Wachstums im Dunkeln und der Ergrünung im Weißlicht.

Tabelle 5: Chloridgehalt von Keimblättern der Gerste, die 6 Tage im Dunkeln auf KNOP'scher Nährlösung (mit A-Z-Lösung nach HOAGLAND) angezogen und zum Zeitpunkt 0 belichtet wurden.

Ergrünungszeit (h)	0	1	2	3	4	5	6	7	24
$\frac{\mu\text{mol Cl}^-}{\text{g Trockengewicht}}$ (n=3)	82	57	67	48	63	57	67	34	46
$\frac{\mu\text{mol Cl}^-}{\text{g Frischgewicht}}$ (n=4)	6,4	4,8	5,1	4,0	5,2	4,0	3,9	2,1	2,8

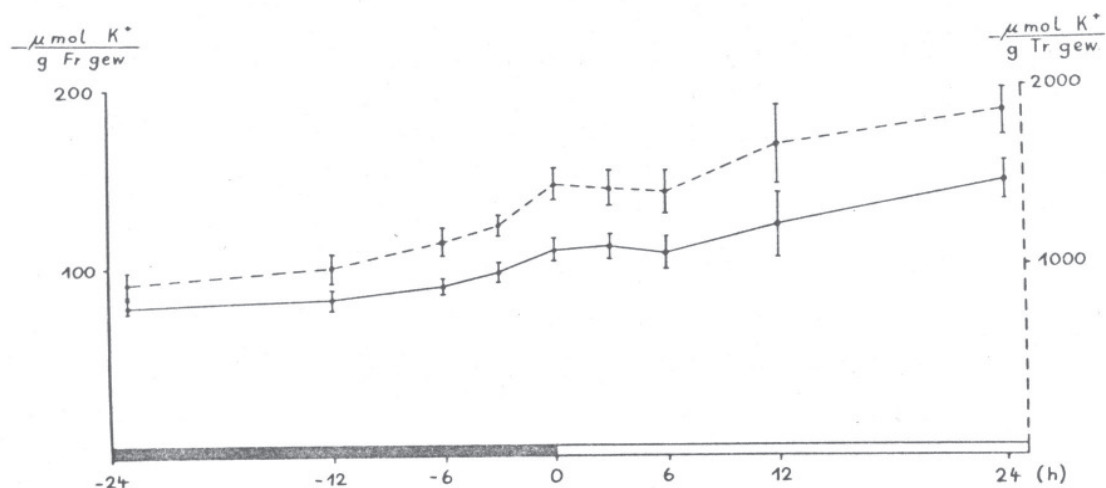


Abb. 24: Kaliumgehalt von Gerstenkeimblättern, die bis zum Zeitpunkt 0 auf KNOP'scher Nährlösung (mit A-Z-Lösung nach HOAGLAND) im Dunkeln gezogen wurden und danach im Weißlicht ergrünt, bezogen auf das Trockengewicht (---) und das Frischgewicht (—) der Blätter. Die Abweichungen vom Mittel sind Standardfehler (n = 4 bis 9).

5.4 Ruhepotential

Im Experiment bezeichnet man die Membranspannung als Ruhepotential (vgl. Kapitel 1), das unter konstanten äußeren Bedingungen über einen mehr oder weniger langen Zeitraum (Minuten) nach Einstich in die Zelle einen konstanten Wert hat.

Eine Änderung der Lichtverhältnisse ruft die geschilderten Oszillationen des Ruhepotentials hervor, die erst nach vielen Minuten abklingen (Abb. 20). Beim Präparieren und Einbringen des Blattes in die Küvette werden neben anderen Bedingungen auch die Lichtverhältnisse geändert (Xenon-Lampe der Klimakammer, Raumbeleuchtung, Mikroskoplampe). Eine Bestimmung des Ruhepotentials wäre erst nach längerer Adaptation möglich.

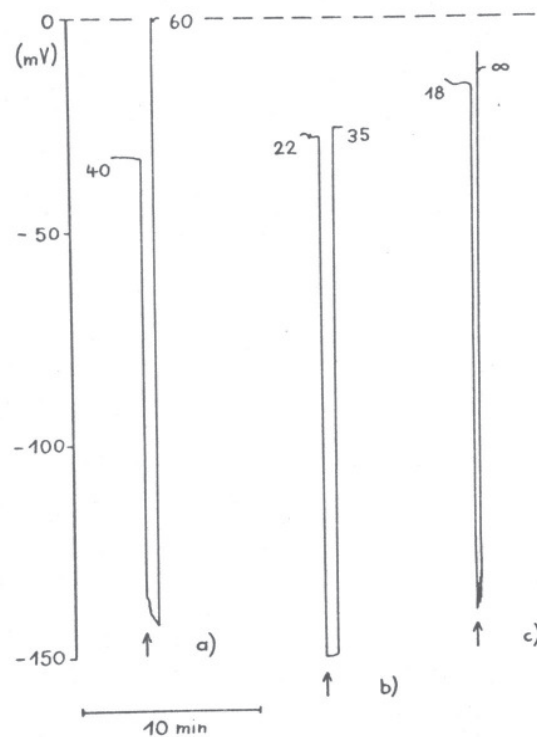


Abb. 25: Ruhepotential der Mesophyllzellen von etiolierten Gerstenkeimlingen nach a) 2 Stunden, b) 3 Stunden, c) 6 Stunden Ergrünung im Weißlicht. Die Zahlen an den Potentialkurven geben die Elektronenwiderstände vor und nach dem Anstich der Zelle in Megohm an, gemessen in der Versuchslösung (APW). Weitere Erläuterungen im Text.

Bei der fortschreitenden Ergrünung der Gerste kann jedoch nicht vorausgesagt werden, ob und wie sich die Bedingungen im Inneren der Zelle während einer langen Adaptation verän-

dern. Deshalb wurde folgende standardisierte Methode zur vergleichenden Messung des Ruhepotentials benutzt: die Blätter wurden in der Klimakammer abgeschnitten, in einer schwarzen Plastiktüte ins Labor gebracht (1 min), bei diffusem Glühlampenlicht präpariert (ca. 1 min), mit der Küvette auf dem Mikroskoptisch montiert, ab diesem Zeitpunkt mit ca. $5 \cdot 10^3 \text{ kerg/cm}^2 \cdot \text{sec}$ belichtet und genau 5 min später mit der Elektrode angestochen. Ausgewertet wurde der erste Maximalausschlag beim Anstich der Zelle (Pfeile in Abb. 25), auch wenn das Potential danach weiter anstieg oder abfiel; bei Griffithsia (THROM 1970) zeigt dieser Maximalausschlag die Höhe des Ruhepotentials an, das sich erst nach einer kurzen Depolarisation einstellt. Ähnliche Phänomene wurden häufiger auch an Oenothera beobachtet (vgl. Anstich in Abb. 9). Da jedes Blatt auf diese Weise gleich behandelt wurde, ist ein Vergleich der Meßergebnisse zu verschiedenen Ergrünungszeiten möglich.

Abb. 25 zeigt drei Beispiele für die Messung des Ruhepotentials: der Nullpunkt ist der elektrische Nullpunkt des Verstärkers ("input locked", d.h. der Eingang ist über 10^9 Ohm gegen Erde kurzgeschlossen); zu Beginn der Messung tritt das Elektrodenpotential in APW auf, welches im Wesentlichen auf das Spitzenpotential der Meßelektrode zurückzuführen ist, da die Meßanordnung symmetrisch (vgl. KERN 1966) und das Asymmetriepotential dementsprechend gering ist. Nach Messung des Spitzenpotentials wird die Zelle angestochen; nach etwa 1 min wird die Elektrode wieder herausgezogen und erneut das Spitzenpotential registriert. Vor und nach der gesamten Messung wird der Widerstand der Elektrode in APW gemessen. Tabelle 1 (Kapitel 3) gibt als Beispiele die Ergebnisse vom Zeitpunkt 0 und 6 Stunden nach Einsetzen der Ergrünung an. Als Mittelwerte für die korrigierten Ruhepotentiale wurden für die Dunkelkontrolle $116 \pm 11 \text{ mV}$, nach 6 Stunden im Licht $120 \pm 9 \text{ mV}$ erhalten (die angegebenen Streuungen sind Standardabweichungen).

Eine Korrektur des Ruhepotentials ist erforderlich, da das Spitzenpotential in Lösungen höherer Ionenkonzentrationen

(numerisch) geringere Werte hat (ADRIAN 1956, KERN 1966, LAVALLEÉ et al. 1969). Wie in Kapitel 3 schon ausführlich erläutert wurde, zieht diese Änderung des Spitzenpotentials eine Verfälschung der tatsächlichen Höhe des Ruhepotentials nach sich. Auf Grund der Mittelwerte der korrigierten Ruhepotentiale kann man keine wesentliche Änderung des Membranpotentials der Gerste während der Ergrünung feststellen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittelwerte des in APW gemessenen und nach KERN (1966) korrigierten Ruhepotentials von Mesophyllzellen der Gerste in Abhängigkeit von der Ergrünung. n = Anzahl der Meßwerte aus 14 parallelen Ergrünungsversuchen.

Ergründungsdauer (h)	0	1	2	3	6	9	12	24
Ruhepotential (korrigiert)(-mV)	116	119	122	124	120	117	118	117
± Standardfehler (mV)	3	2	3	2	2	4	2	3
n =	13	10	13	12	14	14	14	12

Neben der Korrektur des Ruhepotentials wurde in Kapitel 3 die Auswahl der Elektroden mit möglichst niedrigen Spitzenpotentialen erwähnt. Da Elektroden aus demselben Glas und mit derselben Füllung wie die hier benutzten statistisch gleichwertige Ergebnisse liefern, sofern ihr Widerstand zwischen 5 und 20 Megohm (in 3M KCl) liegt und ihr Spitzenpotential nicht negativer als - 12 mV (in Frosch-RINGER-Lösung, BERG u. BONKE, pers. Mitteilung) ist, andere Autoren Elektroden nur bis zu - 5 mV in ähnlichen Lösungen benutzen, wurden als Kompromiß in Abb. 26 nur Ergebnisse eingezeichnet, die mit Elektroden erzielt wurden, deren Spitzenpotential weniger negativ als - 20 mV (in APW) war (vgl. Tabelle 1). Die Zusammenstellung dieser Einzelwerte läßt keine eindeutige Änderung des Ruhepotentials in Abhängigkeit von der Ergrünungszeit erkennen.

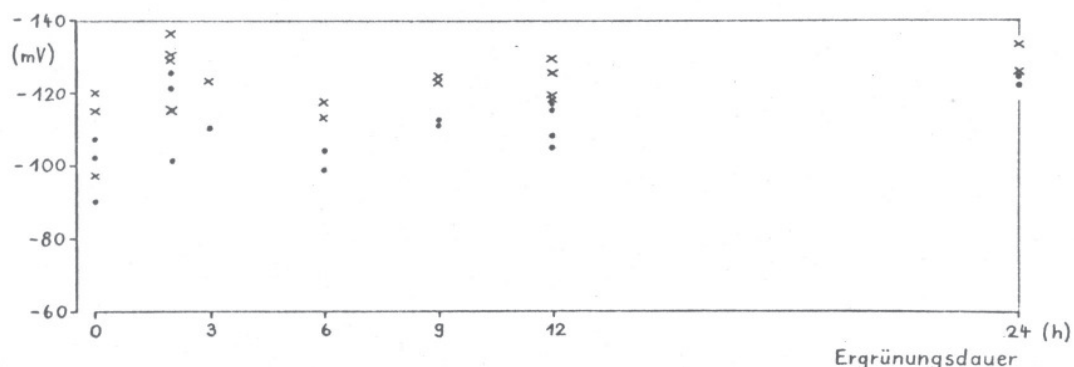


Abb. 26: Ruhepotential von Mesophyllzellen der in Weißlicht ergrünenden Gerste. Spitzenpotential der Elektroden in APW vor der Messung ≤ -20 mV. Punkte bezeichnen das gemessene Ruhepotential, Kreuze das nach KERN (1966) korrigierte Ruhepotential (RP bzw. $RP_{\text{korrr.}}$ in Abb. 7 und Tabelle 1).

5.5 Diskussion

Wie in Kapitel 4.5 schon erwähnt wurde, benutzte WALLER (1925) extrazelluläre Elektroden, um eine Spannungsänderung zwischen den beiden Hälften eines Blattes abzuleiten, die durch unterschiedliche Lichtprogramme auf beiden Seiten vorübergehend auftrat. Im Dunkeln aufgezogene Keimlinge des Senfs und der Bohne zeigten diese lichtinduzierten Reaktionen nicht. Bei der Ergrünung der Bohne im Sonnenlicht erschienen die Lichteffekte wieder; ihre Größe nahm graduell mit der Grünfärbung der Blätter zu.

Diese Ergebnisse wurden nun auch mit den Schwingungen des Membranpotentials von ergrünender Gerste gefunden. Darüber hinaus ist es jetzt möglich, die Zunahme der Schwingungen im Laufe der Ergrünung nicht nur mit dem Chlorophyllgehalt der Blätter, sondern auch mit anderen photosynthetischen Prozessen zu vergleichen, die von LÜTTGE et al. (1973) unter identischen Ergrünungsbedingungen untersucht wurden. Es ist wichtig, daß hierbei unter identischen Bedingungen gearbeitet wird, da z.B. die Zunahme der O_2 -Entwicklung von der Intensität des Lichtes, in dem die Ergrünung stattfindet,

abhängig ist (KIRK u. GOODCHILD 1972); ebenso läßt sich für niedrige Lichtintensitäten keine Korrelation zwischen Chlorophyllsynthese und Ausbildung der Chloroplastenstrukturen feststellen, wie sie in anderen Experimenten für höhere Lichtintensitäten beschrieben wurde (LANG et al. 1971). Ferner spielen für die Ergrünungskinetiken das Alter der Pflanzen (STOBART et al. 1972), die Temperatur und die Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer (ALBERTE et al. 1972) eine Rolle.

Das langsame Ansteigen des Winkels α und die langsamere Abnahme der Halbwertszeit des Licht-an-peaks (Abb. 22) hat sicher seine Ursache in der komplizierten überlagerten Schwingung, die bei der Ergrünung im Dunkelrotlicht deutlicher hervortritt. Vielleicht handelt es sich bei der ersten kurzen Depolarisation um ein ähnliches Ereignis wie bei dem "schnellen photoelektrischen An-Effekt" von Acetabularia (SCHILDE 1968a); wegen der Unterschiede im Pflanzenmaterial und den Versuchsbedingungen ist eine engere Korrelation der Lichteffekte von Acetabularia mit denen der Gerste jedoch nicht möglich.

ANDRIANOV et al. (1972) konnten durch gleichzeitige Registrierung des Membranpotentials und des pH-Wertes der Vakuole von Nitella flexilis - beides gemessen mit interazellulären Mikroelektroden - nachweisen, daß die lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials einen identischen zeitlichen Verlauf haben mit den Protonenflüssen in die Vakuole: der durch Licht hervorgerufenen Depolarisierung entspricht eine Azidifizierung des Vakuolensaftes. Diese Versuche bestätigen auf zellulärer Ebene die Ergebnisse von PALLAGHY u. LÜTTGE (1970) mit Atriplex spongiosa, die lichtinduzierte pH-Änderungen im Medium von Blattstreifen mit den Oszillationen des Membranpotentials korrelierten: auch hier folgt der anfänglichen Depolarisierung des Membranpotentials einer Mesophyllzelle eine Ansäuerung des Gewebes; sie erklären die Protonenflüsse durch passive H^+ -Fluxe am Plasmalemma. ANDRIANOV et al. (1971) nehmen dagegen eine elektrogene Wirkung der H^+ -Fluxraten in die Vakuole an. Ebenso vermutet JESCHKE

(1970) eine Kationenpumpe (hauptsächlich H^+ , vielleicht auch Na^+) für Elodea densa. Die mit ionenspezifischen Elektroden gemessenen Aktivitäten von K^+ und Na^+ in der Vakuole von Nitella flexilis ändern sich nicht bei Beleuchtungswechsel, während isolierte Chloroplasten bei Einschalten des Lichtes Kalium abgeben (ANDRIANOV et al. 1971). Diese Ergebnisse sprechen für einen engen Zusammenhang zwischen den durch Licht ausgelösten pH-Änderungen und den Oszillationen des Membranpotentials.

Die lichtinduzierten pH-Änderungen lassen sich bereits mit normalen pH-Elektroden im umgebenden Medium von Gewebestreifen nachweisen (PALLAGHY u. LÜTTGE 1970, BRINCKMANN u. LÜTTGE 1972, HOPE et al. 1972, LÜTTGE et al. 1973). An der ergrünenden Gerste konnte bestätigt werden, daß die pH-Änderungen enger mit der photosynthetischen O_2 -Entwicklung als mit der CO_2 -Fixierung gekoppelt sind (LÜTTGE et al. 1973, LÜTTGE 1973): nach 3 bis 4 Stunden Ergrünung setzt bei der Gerste die CO_2 -Fixierung ein; zu diesem Zeitpunkt hat die O_2 -Entwicklung etwa ein Drittel ihres maximalen Wertes erreicht, d.h. der Elektronentransport im PS II ist bereits zu 30 bis 50 % aktiv, bevor überhaupt eine CO_2 -Fixierung sichtbar wird. Nach 2 Stunden Ergrünung werden demzufolge nur 0,15 mol CO_2 pro gebildetem mol O_2 fixiert; dagegen beträgt die apparente Protonenaufnahme pro gebildetem mol Sauerstoff 1,5 mol H^+ . Diese Werte und die Ergebnisse von Abb. 20 und 22 zeigen, daß sich die Oszillationen des Membranpotentials und die lichtabhängigen Protonenfluxe beim Ergrünen der Gerste gleich rasch entwickeln wie die photosynthetische O_2 -Produktion; die CO_2 -Fixierung hinkt hinterher. Dieser Befund könnte als weitere Bestätigung der Korrelation zwischen den lichtinduzierten pH-Änderungen und Membranpotentialänderungen herangezogen werden.

Im Zusammenhang mit den lichtinduzierten pH-Änderungen werden Schwankungen des ATP-Gehaltes der Blätter diskutiert, deren zeitlicher Verlauf Ähnlichkeit mit den Oszillationen des Membranpotentials hat (BRINCKMANN u. LÜTTGE 1972). Die pH-Änderungen könnten dabei den Bedarf von Wasserstoffionen

für die ATP-Synthese widerspiegeln. Unter der Voraussetzung, daß die Protonenfluxe einen direkten Einfluß auf das Membranpotential und dessen lichtabhängige Änderungen haben (vgl. jedoch Kapitel 4.4 und 4.5), kann nach der obengenannten Beziehung zwischen pH-Änderungen und ATP-Gehalt ein indirekter Zusammenhang zwischen ATP-Gehalt und Membranpotentialänderungen hergestellt werden. Eine direkte Beziehung ergäbe sich z.B. durch die Annahme, daß die Funktion von Ionenpumpen an den Oszillationen beteiligt ist, wobei die Energieversorgung der Pumpen über ATP gesteuert sein könnte.

An dieser Stelle zeigen sich jedoch die Grenzen, die der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse durch die Wahl des Materials und der Untersuchungsmethoden gesetzt sind: ohne experimentelle Eingriffe in den Stoffwechsel- und Energiehaushalt der Zelle konnte die Photosyntheseabhängigkeit der Membraneffekte bei Oenothera und Hordeum nachgewiesen werden; andererseits können bei der Aufstellung von Korrelationen mit anderen Ereignissen in der Zelle häufig nur qualitative Überlegungen gemacht werden, da das Maß der Korrelation nicht immer bekannt und sicherlich auch von dem physiologischen Zustand der Zelle abhängig ist. Die Kompliziertheit dieser Ereignisse wird bereits an einem relativ einfachen Modell mit künstlichen Lipidmembranen klar, die mit Chloroplastenpigmenten beladen sind: hier treten ebenfalls lichtinduzierte Änderungen des Membranpotentials auf, deren Kinetik und Richtung sich mit der Art des Elektrolytgradienten, des pH-Wertes und des Spannungsgradienten zwischen den durch die Membran getrennten Lösungen ändert (HÜBNER u. TIEN 1972).

Unter Berücksichtigung dieser Vorbehalte kann man folgende Aussagen machen: es hat sich bei Oenothera klar gezeigt, daß die vorübergehenden Änderungen des Membranpotentials an das Zusammenwirken beider Photosysteme gebunden sind. Die parallele Entwicklung der photosynthetischen Prozesse bei der ergrünenden Gerste mit den Schwingungen lassen ihre Verbindung mit lichtinduzierten Änderungen der H^+ - und ATP-Konzentration vermuten.

In diesem Zusammenhang sollen die unterschiedlichen Auffassungen über das Erscheinen von Photosystem I und II im Laufe der Ergrünung erwähnt werden. ALBERTE und Mitarbeiter (1972) zeigten an ergrünenden Bohnenblättern, daß unter bestimmten Versuchsbedingungen der Chlorophyll-Proteinkomplex des PS II vor dem des PS I auftritt, während bisher die umgekehrte Reihenfolge angenommen wurde. LÜTTGE et al. (1973) diskutierten daraufhin beide Möglichkeiten bei der Ausbildung des O_2 -produzierenden Systems der ergrünenden Gerste. Wenn auch für Oenothera gezeigt wurde, daß das Zusammenwirken von PS I und II für die Auslösung der Membranpotentialänderungen nötig ist, so besteht noch Unklarheit darüber, ob aus der Größe der Oszillationen ein Maß für die Ausbildung und Verknüpfung der Photosysteme während der Ergrünung abgeleitet werden kann.

In der Literatur werden zur Entstehung der lichtinduzierten Oszillationen des Membranpotentials verschiedene Hypothesen vertreten. Einige seien hier als Diskussionsbeitrag zitiert.

Nach KURELLA (1971, vgl. BULYCHEV et al. 1972a) ist die Lichtwirkung nicht im Plasmalemma zu suchen (z.B. durch Permeabilitätsänderungen), sondern in den Photosyntheseprozessen. Das Licht ruft in den Chloroplasten schnelle Potentialänderungen hervor (Ladungstrennung, H^+ -Transfer an den inneren Membranen), die anscheinend den langsameren Änderungen des Plasmalemmapotentials zugrunde liegen. Durch den Aufbau dieser Gradienten des elektrochemischen Potentials kommt es zur Induktion von kompensatorischen Ionenfluxen (vermutlich hauptsächlich Protonen), deren zeitliche Reihenfolge von mehreren Faktoren bestimmt wird. Die Kinetik der Membranpotentialänderungen ist auf eine Überlagerung dieser beiden Prozesse zurückzuführen.

BENTRUP et al. (1972) fanden, daß bei Vallisneria-Blättern das Ruhepotential im Licht negativer ist als im Dunkeln. Bei Beleuchtungswechsel ändert sich einerseits die Permeabilität der Membran für Wasserstoffionen, andererseits wird ein System in Gang oder außer Betrieb gesetzt, welches die Membran hyperpolarisiert. Die Autoren nehmen dafür als Beispiel die ATP-Produktion, für die Protonen aufgenommen

werden müssen, wodurch die Membran im Licht hyperpolarisiert werden soll. Da diese Prozesse verschieden schnell einsetzen und aufhören, kommt es zu vorübergehenden Schwingungen des Membranpotentials.

VREDENBERG u. TONK (1973) maßen an Nitella translucens bei Belichtung eine Abnahme des Membranwiderstandes. Parallel dazu wurde der Anteil des Membranpotentials verringert, den eine elektrogene Pumpe geliefert hatte; als Kurzzeitlichteffekt (0,5-2 min) erhielten sie so eine Depolarisation. Danach wird durch den Langzeitlichteffekt (2-20 min) die Pump-rate der elektrogenen Pumpe stimuliert, so daß die Membran hyperpolarisiert wird. Gleichzeitig erhöht sich der Membranwiderstand. Beide Effekte sind an die Photosynthese gebundene Ionentransportprozesse. An dem Kurzzeiteffekt sind die Lichtreaktionen des PS I und II beteiligt, beim Langzeiteffekt ist der steuernde Auslöser vermutlich ein hochenergetisches Zwischen- oder Endprodukt der Photosynthese, das durch die Chloroplastenmembran ins Cytoplasma transportiert wird. Die Autoren nehmen an, daß es sich hierbei nicht um ATP handelt. Sie vermuten ferner, daß die Ursache der Lichtwirkung im ganzen Pflanzenreich die gleiche ist.

In Kapitel 3 wurde schon ausführlich auf die Problematik der Messung von Ruhepotentialen eingegangen. Unter bestimmten methodischen Voraussetzungen und Annahmen wurden bei der Gerste Ruhepotential-Werte erhalten, die keine wesentliche Änderung während der Ergrünung erkennen lassen.

Aus einer Erhöhung des Ruhepotentials hätte man z.B. auf eine lichtabhängige elektrogene Komponente des Membranpotentials schließen können. Nach BENTRUP et al. (1973) ist bei Vallisneria das Potential im Licht etwa 90-110 mV negativer als im Dunkeln (nach 20-30 min Licht bzw. 10-15 min im Dunkeln). Das korrigierte Ruhepotential der Gerste lag zwischen -80 mV (nach 9 Stunden Ergrünung), das höchste bei -136 mV (nach 2 Stunden Ergrünung). Die Mittelwerte der Ruhepotentiale zeigen jedoch nur Unterschiede von 8 mV (Tabelle 6). Die Ruhepotentiale, die mit ausgewählten Elektroden gemessen wurden, liegen zwischen -97 und -137 mV (Abb.26). Es wurde

bisher nicht genau analysiert, ob diese Streuungen aus dem Meßverfahren resultieren oder die Unterschiede in dem biologischen Material widerspiegeln. Auf jeden Fall läßt sich auf Grund dieser Werte keine eindeutige Erhöhung des Ruhepotentials durch Licht feststellen.

Aus der Differenz zwischen dem gemessenen Membranpotential und dem NERNST-Potential der wichtigsten Ionen leitet man die Existenz von elektrogenen Ionenpumpen ab. Das NERNST-Gleichgewichtspotential wird inzwischen auch für Pflanzenzellen häufig aus dem Verhältnis der Ionenkonzentration des Außenmediums und der Ionenkonzentration eines Gewebeextraktes ermittelt (vgl. aber KURELLA 1971). Mit den vorliegenden Ergebnissen der Gerste ist es nicht möglich, elektrogene Anteile an dem Membranpotential zu berechnen, da sich das Gewebe nach 5 min Inkubation in APW sicher noch nicht auf ein Ionengleichgewicht am Plasmalemma eingestellt hat (s. Kapitel 3).

6 Zusammenfassung

Mit Glasmikroelektroden werden an Mesophyllzellen der Nachtkerze (Oenothera) und der Gerste (Hordeum vulgare) vorübergehende lichtinduzierte Änderungen des Membranpotentials gemessen. Die speziellen Schwierigkeiten, die sich beim Messen von Membranpotentialen höherer Landpflanzen ergeben, sowie die Meßmethode werden ausführlich diskutiert (Kapitel 3).

Die lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials laufen in Form von stark gedämpften Schwingungen ab. Versuche mit langwelligem Licht bestätigen, daß diese Schwingungen gleicher Natur sind wie die in der Literatur bereits beschriebenen (Kapitel 4.1.2).

Mit Hilfe von Oenothera-Mutanten, die spezifische, genetisch fixierte Defekte in einzelnen Photosynthesereaktionen haben, wird ohne zusätzliche experimentelle Eingriffe nachgewiesen, daß zur Auslösung der Lichteffekte das Zusammenwirken von Photosystem I und II notwendig ist;

mutierte Zellen, bei denen entweder nur Photosystem I oder II aktiv ist, zeigen keine lichtinduzierten Änderungen des Membranpotentials (Kapitel 4.2.1).

Ebenfalls an panaschierten Oenothera-Blättern wird die Weiterleitung der Lichteffekte von grünen in weiße Zellen untersucht. Die Leitungsgeschwindigkeit ist wesentlich höher als die des symplasmatischen Transportes (Kapitel 4.2.2). Die Weiterleitung basiert auf der symplasmatischen Verbindung der Zellen, die durch die Anwesenheit von Plasmodesmen gewährleistet ist. Die Zahl der Plasmodesmen ist dabei nicht wesentlich höher als bei der Hafer-Koleoptile (Kapitel 4.3). Die gute Leitfähigkeit beruht vermutlich auf einer durchgehenden Verbindung des endplasmatischen Retikulums innerhalb der Plasmodesmen.

Cycloheximid (10 µg/ml) hemmt die lichtinduzierten Membranpotentialänderungen innerhalb von 90 min um 80 %, ohne die Atmung, CO₂-Fixierung, O₂-Entwicklung und die lichtabhängigen pH-Änderungen in dieser Weise zu beeinträchtigen (Kapitel 4.4).

An ergrünenden etiolierten Gerstenkeimlingen wird die Entwicklung der lichtabhängigen Membranpotentialeffekte untersucht. Die meisten Parameter der Kinetik der Effekte erreichen ihre maximalen Werte innerhalb von 6 Stunden Ergrünungsdauer (Kapitel 5.1). Diese rasche Entwicklung wird im Zusammenhang mit anderen photosyntheseabhängigen Prozessen (O₂-Entwicklung, apparente Protonenfluxe), die eine ähnliche Ergrünungskinetik haben, diskutiert. Eine Ergrünung im Dunkelrotlicht verzögert die Entwicklung der Effekte und gibt Aufschluß über die Kinetik des Licht-an-Effektes (Kapitel 5.2).

Von Blattextrakten der Gerste wird der Gehalt an K, Na und Cl angegeben. Die Kaliumkonzentration nimmt im Dunkeln wie im Licht bei 5 - 7 Tage alten Keimlingen zu. Die Natriumkonzentration der auf KNOP'scher Nährlösung gezogenen Pflanzen liegt unter der Nachweisgrenze; Chlorid ist in nur geringen Mengen vorhanden (Kapitel 5.3).

Unter bestimmten methodischen Voraussetzungen läßt sich

während der Ergrünung der Gerste keine wesentliche Änderung des Ruhepotentials von Mesophyllzellen feststellen (Kapitel 5.4).

7 Literaturverzeichnis

- ADRIAN, R.H.: The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. J. Physiol. 133, 631-658 (1956).
- ALBERTE, R.S., J.P. THORNER, A.W. NAYLOR: Time of appearance of photosystems I and II in chloroplasts of greening Jack bean leaves. J. Exp. Bot. 23, 1060-1069 (1972).
- ANDRIANOV, V.K., G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: About the inter-relationship of the resting potential and photosynthesis. Transactions of the Moscow Society of Naturalists 28, 200-206 (1968).
- ANDRIANOV, V.K., G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: Effects of the inhibitors of respiration and photosynthesis on the resting potential of Nitella cells and photoinduced changes of this potential. Phytologija XI, 1014-1020 (1969).
- ANDRIANOV, V.K., A.A. BULYCHEV, G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: Effect of light on the resting potential and cation (H^+ , K^+ , Na^+) activity in the vacuole sap of Nitella cells. Biofizika 16, 1031-1036 (1971).
- ARISZ, W.A.: Significance of the symplasm theory for transport in the root. Protoplasma 46, 5-62 (1956).
- BENTRUP, F.W.: Zellphysiologie. Elektrophysiologie der Zelle. Fortschr. der Botanik 33, 51-61 (1971).
- BENTRUP, F.W., H.J. GRATZ, H. UNBEHAUEN: The membrane potential of Vallisneria leaf cells: evidence for light-dependent proton permeability changes. In: W.P. ANDERSON (ed.): Ion transport in plants. Academic Press, London 1973 (S. 171-182).
- BOOIJ, H.L.: An interpretation of Arisz' experiments on symplasm transport. In: E. BRODA, A. LOCKER, H. SPRINGER-LEDERER: First European Biophysics Congress. Proceedings vol. III: Membranes, Transport. Wien 1971 (S. 125-129).
- BRINCKMANN, E., U. LÜTTGE: Vorübergehende pH-Änderungen im umgebenden Medium intakter grüner Zellen bei Beleuchtungswechsel. Z. Naturforsch. 27b, 277-284 (1972).

- BROWN, D.F., T.E. RYAN, C.E. BARR: The effect of light and darkness in relation to external pH on calculated H^+ fluxes in *Nitella*. In: W.P. ANDERSON (ed.): Ion transport in plants. Academic Press, London 1973 (S. 141-152).
- BULYCHEV, A.A., V.K. ANDRIANOV, G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: Transmembrane potential of higher plants cells and chloroplasts. *Fiziol. Rast.* 18, 248-256 (1971).
- BULYCHEV, A.A., V.K. ANDRIANOV, G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: Micro-electrode measurements of the transmembrane potential of chloroplasts and its photoinduced changes. *Nature* 236, 175-177 (1972a).
- BULYCHEV, A.A., V.K. ANDRIANOV, G.A. KURELLA, F.F. LITVIN: Participation of two photosynthetic pigment systems in generation of the photoelectric response in leaf cells of *Peperomia metallica*. *Fiziol. Rast.* 19, 443 - 445 (1972b).
- BUREŠ, J., M. PENTRÁŇ, J. ZACHAR: Electrophysiological methods in biological research. Academic Press, New York and London 1967.
- CAVALLI-SFORZA, L.: Grundbegriffe der Biometrie. G.Fischer Verlag, Stuttgart 1964.
- DAVIS, R.F.: Membrane electrical potentials in the cortex and stele of corn roots. *Plant. Physiol.* 49, 451-452 (1972).
- DENNY, P., D.C. WEEKS: Effects of light and bicarbonate on membrane potential in *Potamogeton schweinfurthii* (Benn.). *Ann. Bot.* 34, 483-496 (1970).
- DOLZMANN, P.: Photosynthese - Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von *Oenothera*. III. Strukturelle Aspekte. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 300-309 (1968).
- ELLIS, R.J., M.R. HARTLEY: Sites of synthesis of chloroplast proteins. *Nature* ^{New Biol.} 233, 193-196 (1971).
- ELLIS, R.J., I-R. MacDONALD: Specificity of cycloheximide in higher plant systems. *Plant Physiol.* 46, 227-232 (1970).
- EPSTEIN, E.: Mineral nutrition of plants: principles and perspectives. John Wiley and Sons; New York, London, Sidney, Toronto 1972.

- FATT, P.: Intracellular microelectrodes. *Meth.Med.Res.* 9, 381-404 (1961).
- FORK, D.C., U.W. HEBER: Studies on electron-transport reactions of photosynthesis in plastome mutants of *Oenothera*. *Plant Physiol.* 43, 606-612 (1968).
- FRIZZELL, R.A., H.N. NELLANS, L.S. ACHESON, S.G. SCHULTZ: Effects of cycloheximide on influx across the brush border of rabbit small intestine. *Biochim. Biophys. Acta* 291, 302-307 (1973).
- GEDDES, L.A.: Electrodes and the measurement of bioelectric events. Wiley-Interscience, New York, London 1972.
- GOLDSMITH, M.H.M., H.R. FERNÁNDEZ, T.H. GOLDSMITH: Electrical properties of parenchymal cell membranes in the oat coleoptile. *Planta* 102, 302-323 (1972).
- GRADMANN, D.: Einfluß von Licht, Temperatur und Außenmedium auf das elektrische Verhalten von *Acetabularia crenulata*. *Planta* 93, 323-353 (1970).
- deGREEF, J., W.L.BUTLER, T.F. ROTH: Greening of etiolated bean leaves in far red light. *Plant Physiol.* 47, 457 - 464 (1971).
- HALLIER, U.W. Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von *Oenothera*. II. Die Bildung von ATP und NADPH. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 289-299 (1968).
- HALLIER, U.W., U. HEBER, W. STUBBE: Photosynthese-Reaktionen einiger Plastom-Mutanten von *Oenothera*. I. Der reduktive Pentosephosphatzyklus. *Z. Pflanzenphysiol.* 58, 222-239 (1968).
- HANSEN, U.P., D. GRADMANN: The action of sinusoidally modulated light on the membrane potential of *Acetabularia*. *Plant Cell Physiol.* 12, 335-348 (1971).
- HIGINBOTHAM, N.: The mineral absorption process in plants. *Bot. Rev.* 39, 15-69 (1973).
- HOPE, A.B., U. LÜTTGE, E. BALL: Photosynthesis and apparent proton fluxes in *Elodea canadensis*. *Z. Pflanzenphysiol.* 68, 73-81 (1972).
- HÜBNER, J.S., H. TI TIEN: Electrical transients of a chloroplast bimolecular lipid membrane elicited by light flashes. *Biochim. Biophys. Acta* 256, 300-306 (1972).
- JAFFE, M.J.: Phytochrome mediated bioelectric potentials in mung bean seedlings. *Science* 162, 1016-1017 (1968).

- JESCHKE, W.D.: Lichtabhängige Veränderungen des Membranpotentials bei Blattzellen von *Elodea densa*. Z. Pflanzenphysiol. 62, 158-172 (1970).
- KERN, R.: Untersuchungen über die elektrischen Eigenschaften von Glasmikroelektroden. Dissertation, Heidelberg 1966.
- KIRK, J.T.O., D.J. GOODCHILD: Relationship of photosynthetic effectiveness of different kinds of light to chlorophyll content and chloroplast structure in greening wheat and ivy leaves. Aust. J. biol. Sci. 25, 215-241 (1972).
- KURELLA, G.A.: Permeation und Kompartimentverteilung von Elektrolyten im Zusammenhang mit der Genese der Zellelektropotentiale. In: E. BRODA, A. LOCKER, H. SPRINGER-LEDERER (eds.): First European Biophysics Congress. Proceedings vol. III: Membranes, Transport. Wien 1971. (S. 63-66).
- LANG, F., L.M. VROB'EVA, A.A. KRASNOVSKII: Chlorophyll synthesis and formation of chloroplasts in greening normal and mutant maize leaves. Mol. Biol. 5, 366-374 (1971).
- LÄUCHLI, A., U. LÜTTGE, M.G. PITMAN: Ion uptake and transport through barley seedlings: differential effect of cycloheximide. Z. Naturforsch., im Druck.
- LAVALLÉE, M., O.F. SCHANNE, N.C. HÉBERT: Glass Microelectrodes. John Wiley & Sons; New York, London, Sidney, Toronto 1969.
- LÜTTGE, U.: Photosynthetic O_2 evolution and apparent H^+ uptake by slices of greening barley and maize leaves in aerobic and anaerobic solutions. Can. J. Bot., im Druck.
- LÜTTGE, U.: Stofftransport der Pflanzen. Springer Verlag; Berlin, Heidelberg, New York 1973b.
- LÜTTGE, U., E. BALL: Light-independent uncoupler-sensitive ion uptake by green and by pale cells of variegated leaves of higher plants in relation to protein content and chloroplast integrity. Z. Naturforsch. 26b, 158-161 (1971).
- LÜTTGE, U., D. KRAMER, E. BALL: Photosynthesis and apparent proton fluxes in intact cells of greening etiolated barley and maize leaves. Z. Pflanzenphysiol., im Druck.

- LÜTTGE, U., C.K. PALLAGHY: Light-triggered transient changes of membrane-potential in green cells in relation to photosynthetic electron transport. *Z. Pflanzenphysiol.* 61, 58-67 (1969).
- MACKLON, A.E.S., N. HIGINBOTHAM: Potassium and nitrate uptake and cell transmembrane electropotential in excised pea epicotyls. *Plant Physiol.* 43, 888-892 (1968).
- MacROBBIE, E.A.C.: The nature of the coupling between light energy and active ion transport in *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta* 64, 64-73 (1965).
- NADLER, K.D., H.A. HERRON, S. GRANICK: Development of chlorophyll and Hill activity. *Plant Physiol.* 49, 388-392 (1972).
- O'BRIEN, T.P., K.V. THIMANN: Observations on the fine structure of the oat coleoptile. II. The parenchymal cells of the apex. *Protoplasma* 63, 417-442 (1967).
- OELZE-KAROW, H., W.L. BUTLER: The development of photophosphorylation and photosynthesis in greening bean leaves. *Plant Physiol.* 48, 621-625 (1971).
- OSMOND, C.B.: Metabolite transport in C_4 Photosynthesis. *Aust. J. biol. Sci.* 24, 159-163 (1971).
- OSMOND, C.B., U. LÜTTGE, K.R. WEST, C.K. PALLAGHY, B. SHACHER-HILL: Ion absorption in *Atriplex* leaf tissue. II. Secretion of ions into epidermal bladders. *Aust. J. biol. Sci.* 22, 797-814 (1969).
- PALLAGHY, C.K.: Electrophysiological studies in guard cells of tobacco. *Planta* 80, 147-153 (1968).
- PALLAGHY, C.K., U. LÜTTGE: Light-induced H^+ -ion fluxes and bioelectric phenomena in mesophyll cells of *Atriplex spongiosa*. *Z. Pflanzenphysiol.* 62, 417-425 (1970).
- PICKARD, B.G.: Action potentials in higher plants. *Bot. Rev.* 39, 172-201 (1973).
- PITMAN, M.G., S.M. MERTZ jr., J.S. GRAVES, W.S. PIERCE, N. HIGINBOTHAM: Electrical potential differences in cells of barley roots and their relation to ion uptake. *Plant Physiol.* 47, 76-80 (1971).
- ROBARDS, A.W.: The ultrastructure of plasmodesmata. *Protoplasma* 72, 315-323 (1971).

- SADDLER, H.D.W.: The ionic relations of *Acetabularia mediterranea*. J. Exp. Bot. 21, 345-359 (1970).
- SCHANNE, O.F., M. LAVALLÉE, R. LAPRADE, S. GAGNÉ: Electrical properties of glass microelectrodes. Proc. IEEE 56, 1072-1082 (1968).
- SCHILDE, C.: Zur Wirkung des Lichts auf das Ruhepotential der grünen Pflanzenzelle. Planta 71, 184-188 (1966).
- SCHILDE, C.: Schnelle photoelektrische Effekte der Alge *Acetabularia*. Z. Naturforsch. 23b, 1369-1376 (1968a).
- SCHILDE, C.: Zellphysiologie. Elektrophysiologie der Zelle. Fortschr. der Botanik 30, 44-56 (1968b).
- SIBAKA, T.: Excitable cells in *Mimosa*. Science 137, 226 (1962).
- SKIERCZYŃSKA, J., E. ŚPIEWLA, W. BULANDA, R. ŻOŃNIERCZUK, J. SIELEWIEŚIUK: Variations of the longitudinal electrical resistance of Characeae. J. Exp. Bot. 24, 47-63 (1973).
- SPANSWICK, R.M.: Electrophysiological techniques and the magnitudes of the membrane potentials and resistance of *Nitella translucens*. J. Exp. Bot. 21, 617-627 (1970).
- SPANSWICK, R.M.: Electrical coupling between cells of higher plants: a direct demonstration of intercellular communication. Planta 102, 215-227 (1972).
- SPANSWICK, R.M., J.W.F. COSTERTON: Plasmodesmata in *Nitella translucens*: structure and electrical resistance. J. Cell Sci. 2, 451-464 (1967).
- van STEVENINCK, R.F.M., M.E. van STEVENINCK: Effects of inhibitors of protein and nucleic acid synthesis on the development of ion uptake mechanisms in beetroot sclices (*Beta vulgaris*). Physiol. Plant. 27, 407-411 (1972).
- STOBART, A.K., P.R. SHEWRY, D.R. THOMAS: The effect of kinetin on chlorophyll synthesis in ageing etiolated barley leaves exposed to light. Phytochemistry 11, 571-577 (1972).
- STUBBE, W.: Erbliche Chlorophylldefekte bei *Oenothera*. Photographie und Wissenschaft 4, 3-8 (1955).
- TANADA, T.: A rapid photoreversible response of barley root tips in the presence of 3-indoleacetic acid. Proc. Nat. Acad. Sci. 59, 376-380 (1968).

- TANADA, T.: Antagonism between indoleacetic acid and abscisic acid on a rapid phytochrome-mediated process. *Nature* 236, 460-461 (1972).
- THROM, G.: Die lichtabhängige Änderung des Membranpotentials bei *Griffithsia setacea*. *Z. Pflanzenphysiol.* 63, 162-180 (1970).
- THROM, G.: Einfluß von Hemmstoffen und des Redoxpotentials auf die lichtabhängige Änderung des Membranpotentials bei *Griffithsia setacea*. *Z. Pflanzenphysiol.* 64, 281-296 (1971a).
- THROM, G.: Aktionsspektrum der Photosysteme II und I für die lichtabhängige Änderung des Membranpotentials bei *Griffithsia setacea*. *Z. Pflanzenphysiol.* 65, 389-403 (1971b).
- THROM, G.: Einfluß von Entkopplern auf die lichtabhängige Änderung des Membranpotentials und den lichtabhängigen Netto-Protonen-Influx bei *Griffithsia setacea*. *Arch. Protistenk.* 114, 308-329 (1972).
- TYREE, M.T.: The symplast concept. A general theory of symplastic transport according to the thermodynamics of irreversible processes. *J. theor. Biol.* 26, 181-214 (1970).
- UMRATH, K.: Potentialmessungen an *Nitella mucronata* mit besonderer Berücksichtigung der Erregungserscheinungen. *Protoplasma* 9, 576-597 (1930).
- VOLKOV, G.A., L.A. MISYUK: Interpretation of the bioelectrical reaction of plants to stimulation by light. *Dokl. Akad. Nauk. SSR Ser. Biol.* 197, 1435-1437 (1971).
- VOROBIEV, L.N., Y.A. KHITROV: A new type of K^+ -sensitive microelectrode. *Studia biophysica* 26, 49-56 (1971).
- VREDENBERG, W.J.: Light-induced changes in membrane potential of algal cells associated with electron transport. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 37, 785-792 (1969).
- VREDENBERG, W.J.: The potential response of plasmalemma, tonoplast and cell wall upon photosynthetic energy conversion in *Nitella*. In: E. BRODA, A. LOCKER, H. SPRINGER-LEDERER (eds.): First European Biophysics Congress. Proceedings vol III: Membranes, Transport. Wien 1971a (S.435-439).

- VREDENBERG, W.J.: Changes in membrane potential associated with cyclic and noncyclic electron transport in photochemical system I in *Nitella translucens*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 42, 111-118 (1971 b).
- VREDENBERG, W.J. A method for measuring the kinetics of energy-dependent changes in the electrical membrane resistance of metabolizing plant cells. *Biochim. Biophys. Acta* 274, 505-514 (1972).
- VREDENBERG, W.J., W.J.M. TONK: Photosynthetic energy control of an electrogenic ion pump at the plasmalemma of *Nitella translucens*. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 354-368 (1973).
- WALLER, J.C.: Plant electricity. I. Photo-electric currents associated with the activity of chlorophyll in plants. *Ann. Bot.* 39, 515-538 (1925).
- WALKER, N.A.: Microelectrode experiments on *Nitella*. *Aust. J. biol. Sci.* 8, 476-489 (1955).
- WEBSTER, P.L.: Effects of cycloheximide on mitosis in *Vicia faba* root meristem cells. *J. Exp. Bot.* 24, 239-244 (1973).
- WILSON, S.B., A.L. MOORE: The effects of protein synthesis inhibitors on oxidative phosphorylation by plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 292, 603-610 (1973).

D A N K S A G U N G

Hiermit möchte ich mich bei allen Mitgliedern und Angestellten des Fachbereichs bedanken, ohne deren Rat und Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre. Besonders danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. U. Lüttge für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit;

Frau B. Bonke, Frau G. Zirke und Herrn P.L. Berg für Anregungen und Hilfe bei der Lösung experimenteller Probleme der Elektrophysiologie;

Fräulein E. Ball für die Durchführung der ^{14}C -Experimente und vielfältige andere technische Hilfe;

Herrn Dr. D. Kramer und Frau G. Langer für die Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten;

Herrn Prof. Dr. R. Menzel für das Überlassen von Pyrex-Glas-kapillaren;

Herrn Prof. Dr. W. Stubbe (Düsseldorf) für Samen und Pflanzen der Oenothera-Mutanten;

Herrn Prof. Dr. D. Köhler für die Bereitstellung von Rechenprogrammen;

Herrn Prof. Dr. W.R. Ullrich für die Übersetzung einiger Literaturstellen;

Frau D. Schäfer für das Zeichnen einiger Abbildungen;

den Herren H. Immig und H. Klingelhöfer der Werkstatt für ihre sorgfältige Arbeit;

den Gärtnern des Botanischen Gartens für die Betreuung der Pflanzen

und nicht zuletzt der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein Doktorandenstipendium.

Verzeichnis der den Abbildungen zugrunde liegenden Versuche.

Abbildung Nr.	Versuch Nr.
7	302
8	20
9	11
10	21 - 24
11	27
12	a) 189, b) 28
13	a) 30, b) 32
14	42
15	31, 35
17	251
18	251
19	111
20	90, 79, 82, 97, 99
21	97
23	154
25	296, 302, 304

Neg. Nr.

1	665
16	a) 663 u. 528 b) 865 u. 847 c) 864 u. 851

L E B E N S L A U F

Am 22.11.1946 wurde ich, Enno Brinckmann, als Sohn des damaligen Kaufmanns Ernst Brinckmann und seiner Ehefrau Dorothea, geb. Sievert, in Holzminden an der Weser geboren. 1953 kam ich in die Knabenschule. Wegen neuer beruflicher Aufgaben meines Vaters zogen wir 1954 nach Darmstadt, wo ich meine Grundschulausbildung vollendete. Ab 1957 war ich Schüler des altsprachlichen Ludwig-Georgs-Gymnasiums in Darmstadt. Nach dem Abitur 1966 begann ich an der TH Darmstadt mein Biologiestudium; im 8. Semester studierte ich an der Universität Tübingen. 1971 legte ich in Darmstadt mein Diplom ab und arbeitete seitdem als Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes im Fachbereich Biologie der TH Darmstadt an einer Dissertation über ein pflanzenphysiologisches Thema.

